

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



**“AVANCES EN EL DIAGNOSTICO MOLECULAR Y EN
EL TRATAMIENTO DE LOS GLIOMAS DE BAJO
GRADO EN LA EDAD PEDIÁTRICA”**

TESIS DOCTORAL

Alvaro Lassaletta Atienza

DIRECTOR DE TESIS

Luis Madero López

Madrid 2017



**EL DR. LUIS MADERO LÓPEZ, JEFE DEL SERVICIO DE HEMATO-
ONCOLOGÍA Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO INFANTIL NIÑO JESÚS DE MADRID**

CERTIFICA: Que Don **ALVARO LASSALETTA ATIENZA**, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado *“Avances en el diagnóstico molecular y en el tratamiento de los gliomas de bajo grado en la edad pediátrica”*, para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 12 de Junio de 2017

Fdo. Luis Madero López



**THE HOSPITAL FOR SICK
CHILDREN**



**UNIVERSITY OF TORONTO
FACULTY OF MEDICINE**

Eric Bouffet, MD, FRCP (C)

Garron Chair in Childhood Cancer Research

Paediatric Neuro-oncologist

Division of Haematology/Oncology

Phone: 416-813-7457

Fax: 416-813-5327

Email: eric.bouffet@sickkids.ca

Professor of Paediatrics

University of Toronto

Senior Associate Scientist

**Research Institute at The Hospital for Sick
Children**

Tuesday, May 30, 2017

RE: PUBLICATIONS - THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN

To whom it may concern,

I, Dr. Eric Bouffet, as head of the Pediatric Neuro Oncology Section, in the Division of Hematology/Oncology, at the Hospital for Sick Children, in Toronto, Canada, confirm that Alvaro Lassaletta, during his two years of his Pediatric Neuro Oncology fellowship at our department in the Hospital for Sick Children (2014-2016) performed several projects involving Pediatric Low Grade Gliomas, which translated into the following three publications:

1. Lassaletta A, Scheinemann K, Zelcer SM, Hukin J, Wilson BA, Jabado N, Carret AS, Lafay-Cousin L, Larouche V, Hawkins CE, Pond GR, Poskitt K, Keene D, Johnston DL, Eisenstat DD, Krishnatry R, Mistry M, Arnoldo A, Ramaswamy V, Huang A, Bartels U, Tabori U, Bouffet E. Phase II Weekly Vinblastine for Chemotherapy-Naïve Children With Progressive Low-Grade Glioma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium Study. J Clin Oncol. 2016 Aug 29. pii: JCO681585. [Epub ahead of print]
2. Lassaletta A, Zapotocky M, Mistry M, Ramaswamy V, Honnorat M, Krishnatry R, Guerreiro Stucklin A, Zhukova N, Arnoldo A, Ryall S, Ling C, McKeown T, Loukides J, Cruz O, de Torres C, Ho CY, Packer RJ, Tatevossian R, Qaddoumi I, Harreld JH, Dalton JD, Mulcahy-Levy J, Foreman N, Karajannis MA, Wang S, Snuderl M, Nageswara Rao A, Giannini C, Kieran M, Ligon KL, Garre ML, Nozza P, Mascelli S, Raso A, Mueller S, Nicolaides T, Silva S, Perbet R, Vasiljevic A, Faure Conter C, Frappaz D, Leary S, Crane C, Chan A, Ng HK, Shi ZF, Mao Y, Finch E, Eisenstat D, Wilson B, Carret AS, Hauser P, Sumerauer D, Krskova L, Larouche V, Fleming A, Zelcer S, Jabado N, Rutka JT, Dirks P, Taylor MD, Chen S, Bartels U, Huang A, Ellison DW, Bouffet E, Hawkins C, and Tabori U. Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF-V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas J Clin Onc. 2017. Accepted for publication May 2017.

3. Lassaletta A, Guerreiro Stucklin A, Ramaswamy V, Zapotocky M, McKeown T, Hawkins C, Bouffet E, Tabori U. Profound clinical and radiological response to BRAF inhibition in a 2-month-old diencephalic child with hypothalamic/chiasmatic glioma. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Nov;63(11):2038-41.

I authorize Dr. Lassaletta, to include these publications in his doctoral thesis entitled “*AVANCES EN EL DIAGNOSTICO MOLECULAR Y EN EL TRATAMIENTO DE LOS GLIOMAS DE BAJO GRADO EN LA EDAD PEDÍATRICA*”, which will be defended at the Universidad Autonoma of Madrid in September 2017.

Sincerely,

Eric Bouffet, MD, FRCP(C)
Director, Paediatric Brain Tumour Program
The Hospital for Sick Children

Uri Tabori, MD
Neuro Oncologist
Division of Haematology/Oncology, The
Hospital for Sick Children
Associate Professor of Paediatrics, University
of Toronto
Scientist, SickKids Research Institute and The
Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour
Research Centre

A mi padre
el Dr. Luis Lassaletta Garbayo,
Cirujano Pediátrico,
mi modelo a seguir tanto en lo profesional
como en lo personal.
¡Gracias a ti soy lo que soy!

AGRADECIMIENTOS

- A *Luis Madero*, mi director de tesis, mi jefe y sobre todo mi amigo, por creer en mi desde que nos conocimos en cuarto de Medicina y darme la oportunidad de dedicarme a la Oncología Pediátrica.

- A *Eric Bouffet*, Jefe del Servicio de Neurooncología del Hospital SickKids de Toronto, por darme la oportunidad de compartir con él y con todo su equipo dos hermosos años de mi vida, de desarrollar los trabajos de esta tesis y de enseñarme no solo sus conocimientos sino su forma de ser.

- A todos mis compañeros del Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, por acompañarme durante estos últimos 14 años y por conseguir que cada mañana cuando me despierto vaya a trabajar con ilusión.

- A mis padres, *Luis y Aurora*, que me han enseñado a valorar las cosas según la importancia que tienen y siempre a mirar hacia delante.

- A mi hermano mayor *Luis*, que siempre ha sido mi ejemplo a seguir y me ha ayudado tanto durante la carrera, la residencia y mi vida profesional.

- A mi hermana *Aurora*, un ejemplo de superación y de cómo no rendirse ante las adversidades.

- A mi mujer *Gema*, por dejarlo todo y venirse conmigo a Toronto y siempre estar a mi lado a las duras y a las maduras.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Epidemiología	19
1.2. Anatomía patológica	20
1.3. Presentación clínica y localización	20
1.4. Factores predisponentes	22
1.4.1. Neurofibromatosis tipo 1	22
1.4.2. Esclerosis tuberosa	28
1.5. La edad como factor pronóstico	29
1.6. Estratificación y análisis molecular	30
1.6.1. Fusiones BRAF	32
1.6.2. Mutaciones BRAF	32
1.6.3. Alteraciones en FGFR	33
1.6.4. Alteraciones en MYB	34
1.6.5. Alteraciones en la familia de NTRK	34
1.7. Mecanismos moleculares y de resistencia	36
1.8. Tratamiento quirúrgico en los gliomas de bajo grado pediátricos	44
1.9. Tratamiento radioterápico en los gliomas de bajo grado pediátricos	46
1.10. Tratamiento quimioterápico en los gliomas de bajo grado pediátricos	48
1.11. Transición de los protocolos con quimioterapia convencional a tratamientos molecularmente dirigidos en los gliomas de bajo grado pediátricos	56
2. JUSTIFICACIÓN	63

3. OBJETIVOS	67
3.1. Objetivos principales	69
3.2. Objetivos secundarios	71
 4. RESULTADOS	 73
4.1. Artículo 1	75
4.2. Artículo 2	81
4.3. Artículo 3	87
 5. DISCUSIÓN	 93
5.1. Nuevos tratamientos en gliomas de bajo grado pediátricos	95
5.1.1. Utilidad de los diferentes regímenes de quimioterapia y su toxicidad en el tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos	95
5.1.2. La experiencia de la vinblastina en el tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos	98
5.1.3. Progresión inicial de tumores tratados con vinblastina	100
5.1.4. Toxicidad de la vinblastina	101
5.1.5. Tasa de respuesta, supervivencia libre de progresión y resultado en la visión	102
5.1.6. Pacientes con neurofibromatosis tipo 1	103
5.1.7. Pacientes mayores de 10 años	104
5.1.8. Estudios biológicos	105
5.1.9. Calidad de vida	106
5.2. Avances en el conocimiento molecular de los gliomas de bajo grado pediátricos	109
5.2.1. La mutación BRAF V600E es frecuente en los gliomas de bajo grado pediátricos	109

5.2.2. Los gliomas pediátricos de bajo grado con la mutación BRAF V600E presentan mal pronóstico con tratamientos convencionales	111
5.2.2.1. Respuesta a la cirugía de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E	112
5.2.2.2. Respuesta a la radioterapia de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E	113
5.2.2.3. Respuesta a la quimioterapia convencional de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E	114
5.2.3. CDKN2A identifica un subgrupo de peor pronóstico de los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E	114
5.2.4. Los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E responden peor a la quimioterapia convencional	117
5.2.5. Los inhibidores BRAF V600E podrían ser una alternativa de tratamiento en estos pacientes	118
5.3. Características moleculares y clínicas de los lactantes con gliomas de bajo grado	121
5.3.1. Gliomas de bajo grado en lactantes	121
5.3.2. Prevalencia de las mutaciones BRAF en lactantes con gliomas de bajo grado	123
6.- CONCLUSIONES	127
7.- ABREVIATURAS	133
8.- BIBLIOGRAFIA	137

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Epidemiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son la segunda causa de cáncer infantil en niños de 0 a 14 años (aproximadamente un 20% del total) y la tercera causa de cáncer infantil en los adolescentes de 15 a 19 años (aproximadamente un 10% del total). Los tumores del SNC son la primera causa de muerte secundaria al cáncer en niños y adolescentes¹. Los gliomas de bajo grado son los tumores del SNC más frecuentes en la población pediátrica². Según las distintas series publicadas representan entre un 30 y un 50% de todos los tumores del SNC en menores de 15 años de edad³. Alrededor del 75% de todos los gliomas con confirmación histológica en la edad pediátrica son gliomas de bajo grado (grado I y II de la clasificación de la OMS)⁴. La incidencia anual de los gliomas de bajo grado se estima que es de 10 a 12 casos por cada 1.000.000 niños de entre 0 y 14 años⁵. En España, según el registro nacional de tumores infantiles (RNTI)⁶, los tumores cerebrales son la segunda causa de cáncer infantil y dentro de ellos, los gliomas de bajo grado son los tumores más frecuentes. Conviene señalar que dado que en estos tumores el tratamiento muy frecuentemente es exclusivamente quirúrgico y los servicios de neurocirugía muchas veces no incluyen a estos pacientes en los registros de cáncer infantil, la valoración de las cifras en los gliomas de bajo grado, suelen ser infraestimadas. La edad al diagnóstico más frecuente para los gliomas de bajo grado es entre los 6 y los 9 años, aunque pueden aparecer a cualquier edad⁷.

1.2.- Anatomía patológica

Los gliomas de bajo grado son tumores de grado I y II de la clasificación de la OMS con origen astrocítico, oligodendrogial y mixto (glioneuronal)^{8,9}. Conforman un grupo muy heterogéneo de subtipos histológicos, localizaciones, distintas edades y diferentes características biológicas. En este grupo se suelen incluir los tumores mixtos glioneuronales. El subtipo histológico más frecuente es el astrocitoma pilocítico (con sus características fibras de Rosenthal), pero existen multitud de variantes histológicas como el astrocitoma difuso, el ganglioglioma o el xantoastrocitoma pleomórfico. En la edad pediátrica no son frecuentes algunos subtipos histológicos como el oligodendroglioma o el oligoastrocitoma que se ven mucho más frecuentemente en los adultos.

1.3.- Presentación clínica y localización

La mayoría de los pacientes presentan una historia prolongada de síntomas y signos clínicos. Estos síntomas vienen definidos por la localización del tumor y por la presencia o no de hidrocefalia crónica (tumores de fosa posterior, localización en el “tectum” o astrocitomas subependimarios gigantocelulares o SEGAs). Los síntomas visuales son frecuentes en los gliomas de la vía óptica e incluyen disminución de la agudeza visual, alteraciones de los campos visuales, nistagmo, estrabismo, etc. Los pacientes con tumores de la región supraselar, además de síntomas visuales pueden presentar alteraciones hormonales como el

déficit de hormona de crecimiento o el síndrome diencefálico. La localización en el tronco cerebral puede producir síndrome de Parinaud (localización pineal), vómitos y pérdida de peso inexplicados, hipotensión ortostática, disfagia, disfonía e incluso apneas centrales u obstructivas.

Los gliomas de bajo grado pueden localizarse en cualquier estructura del SNC. La localización más frecuente es la fosa posterior (20-25%)². Otras localizaciones típicas son el tronco cerebral, o la línea media supratentorial que incluye vías ópticas, región supraselar, el “tectum” y la región talámica. La localización en los hemisferios cerebrales es más típica de los gliomas de bajo grado de origen neuronal como los tumores neuroepiteliales disembrionarios (DNET), que suelen manifestarse con crisis convulsivas del lóbulo temporal. La localización primaria espinal se describe en alrededor de un 5% de los casos. La diseminación leptomeningea de estos tumores está poco estudiada y se sospecha pueda estar infraestimada, pues la resonancia magnética espinal y la realización de un líquido cefalorraquídeo (LCR) al diagnóstico no son práctica habitual en los pacientes que no presentan signos o síntomas de diseminación. Se cree se sitúa en torno al 5-10% de los casos¹⁰.

1.4.- Factores predisponentes

Entre los factores predisponentes para desarrollar gliomas de bajo grado en la edad pediátrica se incluyen especialmente la neurofibromatosis tipo 1 (NF-1) y la esclerosis tuberosa.

1.4.1.- Neurofibromatosis tipo 1

La neurofibromatosis tipo 1, causada por una mutación germinal heterocigótica en el gen NF-1 localizado en el brazo largo del cromosoma 17, se asocia a distintos tipos de cáncer. Los tumores más frecuentes localizados en el sistema nervioso central en estos pacientes son los gliomas de bajo grado, la mayoría del subtipo histológico astrocitoma pilocítico. Los gliomas de bajo grado comprenden la mayoría de tumores intracraneales en los paciente pediátricos con NF-1¹¹⁻¹³. Los gliomas de bajo grado en niños con NF-1 pueden considerarse un subgrupo específico dentro de los gliomas de bajo grado en pacientes pediátricos y precisan de una serie de consideraciones especiales a la hora de programar el tratamiento y el diagnóstico. Un paciente con NF-1 tiene una probabilidad en torno al 20% de desarrollar un glioma de bajo grado ¹⁴⁻¹⁶. Debido a las características radiológicas típicas de los gliomas de bajo grado en pacientes con NF-1, estos pacientes suelen diagnosticarse exclusivamente con pruebas de imagen y muchas veces no se realiza una biopsia o resección de la tumoración¹⁷. Estos diagnósticos exclusivamente radiológicos a veces derivan en los siguientes problemas: 1) el aumento de pruebas de screening que identifican “gliomas” en pacientes

completamente asintomáticos en base a los hallazgos de RM (muchos de estos pacientes nunca desarrollarán lesiones sintomáticas); 2) la ausencia de crecimiento con el tiempo de muchos de estos “gliomas” radiológicos que se traduciría en la duda de si estos “gliomas” eran verdaderas neoplasias; 3) la dificultad en poder diferenciar verdaderos gliomas con tejido hamartomatoso o displásico típico de la NF-1; y 4) la falta de tejido tumoral que pueda ser utilizado para estudios biológicos.

Desde hace décadas conocemos que la mayoría de gliomas de bajo grado asociados a NF-1 se localizan en las vías ópticas, afectando a uno o a los dos nervios ópticos, al quiasma óptico o a otras estructuras diencefálicas^{15,17}. Los gliomas del nervio óptico, normalmente se diagnostican durante los 3-4 primeros años de vida. No está claro si estas lesiones son de origen congénito o se desarrollan tras el nacimiento. Los gliomas del nervio óptico no son los únicos gliomas de bajo grado que se desarrollan en niños o adultos con NF-1. Otras estructuras de la línea media, incluyendo el tronco cerebral, también pueden presentar gliomas de bajo grado. En los pacientes con NF-1 que desarrollan gliomas de bajo grado del tronco cerebral o del cuerpo caloso, el diagnóstico suele ser más tardío en la infancia tardía o en la adolescencia¹⁸. Como ocurre en los gliomas de nervio óptico, la historia natural de los gliomas localizados fuera de las vías ópticas es impredecible. Algunos tumores crecen durante periodos cortos de tiempo y luego regresan espontáneamente, y otros presentan un crecimiento progresivo con importante sintomatología (especialmente los tumores que afectan al tronco cerebral). El mecanismo que está detrás de estos periodos de

crecimiento-regresión espontánea en los gliomas de bajo grado en los pacientes con NF-1 es todavía desconocido. El descubrimiento de por qué estos tumores pueden presentar regresión espontánea sería de máxima importancia para el tratamiento de los mismos. La mayor morbilidad en los niños con NF-1 y gliomas de bajo grado es la pérdida de visión¹⁹. Sin embargo, el mecanismo de la pérdida de visión en estos pacientes no está del todo definido. Clínicamente, pacientes con pequeñas lesiones pueden perder la totalidad de la visión, mientras que otros con lesiones de gran tamaño mantienen la agudeza visual.

Muchos de los pacientes con NF-1 y gliomas de bajo grado no precisan de tratamiento, ya sea porque están asintomáticos o porque tengan estabilidad en sus síntomas clínicos. Incluso lesiones que progresan lentamente desde el punto de vista radiológico a veces no precisan tratamiento, ya que después de cierto tiempo, estas lesiones pueden estabilizarse e incluso regresar espontáneamente²⁰⁻²². En aquellos pacientes que precisen tratamiento, éste a veces se administra durante un tiempo limitado. Los gliomas de nervio óptico, normalmente aumentan de tamaño hasta los 5 o 6 años de edad, y posteriormente se frena su crecimiento por circunstancias todavía desconocidas. Debido a la localización de estos gliomas en las vías ópticas, la cirugía no es una opción terapéutica y la mayoría de las veces no se requiere para el diagnóstico. Debido a los riesgos de complicaciones vasculares y al riesgo de desarrollar transformación maligna e incluso segundos tumores, la radioterapia no se suele utilizar en el tratamiento de estos tumores, así que la mayoría de los pacientes que requieren tratamiento son tratados con quimioterapia. Existen muchos regímenes utilizados en el tratamiento de los

gliomas de bajo grado en pacientes pediátricos. En niños con NF-1, la combinación de vincristina + carboplatino ha demostrado que en los pacientes con gliomas de bajo grado y NF-1, los resultados son mejores que en los pacientes con gliomas de bajo grado que no tienen NF-1²³. Con supervivencias superando el 95% a largo plazo, la supervivencia libre de progresión se ha demostrado mayor en los pacientes con NF-1²⁴⁻²⁶. En un estudio de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) que incluía 108 pacientes pediátricos con NF-1 y gliomas de bajo grado, 43 fueron observados sin tratamiento y 55 recibieron quimioterapia²⁷. La supervivencia global a los 12 años fue del 96% y la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue del 73% (significativamente mayor que en niños sin NF-1). Este estudio demostró también que la localización fuera de las vías ópticas disminuye algo la supervivencia. Resultados similares se encontraron en el estudio norteamericano del Children's Oncology Group (COG) en 131 pacientes pediátricos con NF-1 y gliomas de bajo grado²⁶. La supervivencia global fue del 98%. La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue de casi el 70% comparada con el 39% en los pacientes sin NF-1. Además los pacientes con NF-1 tuvieron una mejor respuesta radiológica que aquellos sin NF-1. En este estudio, 3 pacientes con NF-1 desarrollaron segundos tumores. Los tres habían recaído de sus gliomas y en los tres se utilizó temozolomida como tratamiento de segunda línea, subrayándose la posible implicación del tratamiento con alquilantes en estos segundos tumores y la advertencia de intentar evitarlos en pacientes con NF-1. La vinblastina semanal en monoterapia también ha demostrado una buena eficacia en estos pacientes²⁸. En 9 pacientes con NF-1 y gliomas de las vías ópticas la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue del 75%. A pesar de estos resultados, el mayor

problema aun no resuelto en los niños con NF-1 y gliomas de bajo grado es que un porcentaje no desdeñable presenta pérdida de agudeza visual a pesar de la estabilización del tumor en los estudios radiológicos¹⁹.

La experiencia hasta ahora con la quimioterapia se debe tener en cuenta cuando incorporemos los nuevos agentes biológicos al arsenal terapéutico en estos pacientes. Dados los excelentes resultados de la quimioterapia en la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de estos pacientes, la valoración de la efectividad de los nuevos agentes biológicos debe focalizarse en la mejoría funcional de los pacientes (por ejemplo: la agudeza visual). Aunque de forma anecdótica, ha habido respuesta en la agudeza visual de algunos pacientes refractarios a quimioterapias convencionales con bevacizumab²⁹⁻³¹.

El conocimiento de la neurobiología de los gliomas relacionados con la NF-1 es muy pequeño debido a: 1) el pequeño número de pacientes con gliomas de bajo grado y NF-1 en los que se realiza cirugía; 2) cuando se realiza cirugía, las biopsias que se toman son normalmente de un material muy escaso; y 3) el material congelado disponible para estudios es muy limitado. La casi totalidad del conocimiento actual se ha desarrollado a partir de modelos en ratones. Se ha descrito que la inactivación bialélica del gen NF-1 está presente en los gliomas de bajo grado asociados a NF-1 y que esta inactivación se acompaña de una actividad en la vía de señalización RAS-MAPK. Además, ratones modificados genéticamente utilizando inactivación condicional bialélica del gen NF-1 han desarrollado gliomas de bajo grado similares a los de los pacientes con NF-1. Mientras que en los

gliomas de bajo grado del subtipo astrocitoma pilocítico de pacientes sin NF-1 se ha demostrado una hiperactividad de la señalización RAS, los modelos de ratón han sugerido que la vía mTOR puede ser de gran importancia en los tumores con NF-1. Un estudio con rapamicina (inhibidor de mTOR) combinado con erlotinib (inhibidor de EGFR) demostró cierta actividad en gliomas de pacientes con NF-1. Seis de nueve pacientes estabilizaron el crecimiento tumoral, aunque sólo uno obtuvo una respuesta parcial³². Comparando la experiencia en humanos con gliomas de bajo grado sobre todo de localizaciones en la vía óptica, los modelos de ratón han demostrado que estos tumores sólo se activan en periodos de desarrollo determinados. Siguiendo esta idea, tres estudios recientes demuestran que tratamientos cortos profilácticos con inhibidores de MEK durante el periodo neonatal en los ratones, mejora los defectos gliales del cuerpo caloso y del cerebelo, aportando beneficios a largo plazo de las funciones motoras. Es por ello que los inhibidores de MEK durante estas etapas del desarrollo podrían ser eficaces en controlar e incluso prevenir el desarrollo de gliomas de bajo grado así como otras patologías asociadas a la NF-1 en el sistema nervioso central. Los inhibidores de MEK se están investigando en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado y NF-1 y los resultados preliminares son muy prometedores ya que se han visto respuestas favorables a estos tratamientos³³. La experiencia hasta ahora sugiere que los pacientes con NF-1 y gliomas de bajo grado podrían ser candidatos al tratamiento con dianas moleculares, pero para ello, debemos conocer más sobre su biología y sus alteraciones moleculares.

1.4.2.- Esclerosis tuberosa

La esclerosis tuberosa o también llamada complejo esclerosis tuberosa, es una enfermedad neurocutánea hereditaria autosómica dominante que se caracteriza por la presencia de hamartomas múltiples benignos en múltiples órganos incluyendo el cerebro, ojos, corazón, pulmón, hígado, riñón y en la piel³⁴. El diagnóstico de la esclerosis tuberosa es clínico y la expresión de la enfermedad es muy variable. La incidencia es de aproximadamente 1 en 5000 a 10000 recién nacidos vivos. Está causada por la mutación en uno de los dos genes TSC1 o TSC2. El 80% de las mutaciones son “de novo”. El conocimiento actual define estos genes como genes supresores de tumores³⁵. El avance más importante en la patogenia de esta enfermedad ha sido la definición del papel que tiene el complejo hamartina-tuberina a través de la inhibición de la señalización celular mediado por el mecanismo diana de la rapamicina (mTOR). La vía de señalización mTOR es muy importante para la regulación proteica, el ciclo celular y la respuesta a la hipoxia³⁶⁻⁴².

La lesión cerebral característica de la esclerosis tuberosa es el astrocitoma de células gigantes subependimario (SEGA). El SEGA es un tumor benigno de lento crecimiento que se localiza en el área periventricular. Aproximadamente entre el 5 y el 20% de los pacientes con esclerosis tuberosa desarrollarán un SEGA. Estos tumores cuando crecen pueden provocar una hidrocefalia obstructiva. Suelen hacerse sintomáticos entre los 10 y los 30 años de edad, aunque pueden manifestarse a edades más tempranas. Para diferenciar un SEGA de los nódulos

subependimarios típicos de esta enfermedad, se utilizan una serie de características como la aparición de hidrocefalia, nueva sintomatología clínica, edema de papila o crecimiento de la lesión en resonancias magnéticas (RM) seriadas. Ante la ausencia de estas peculiaridades, se asume que una tumoración de más de 10 mm se define como SEGAs.

Los inhibidores de mTOR han revolucionado el tratamiento de esta enfermedad. No sólo son útiles en el tratamiento de los SEGAs, sino que también tienen un efecto beneficioso en el control de las crisis epilépticas, los angiomiolipomas renales, la linfangioleiomiomatosis pulmonar y los angiofibromas faciales⁴³⁻⁴⁵. El ensayo clínico multicéntrico EXIST-1 randomizó a pacientes pediátricos y adultos (mediana de edad 9,5 años; rango, 0,8 – 26,6 años) con esclerosis tuberosa y SEGAs a recibir everolimus (inhibidor de mTOR) o placebo. Con una mediana de seguimiento de 10 meses, la proporción de pacientes que experimentaron una reducción del tumor de más del 50% fue del 35% en el grupo del everolimus, frente al 0% en el grupo del placebo⁴⁶. Estos resultados se han confirmado con un seguimiento más prolongado^{47,48}.

1.5.- La edad como factor pronóstico

Distintos grupos han demostrado que los menores de 3 años, especialmente los menores de 1 año con gliomas de bajo grado tienen peores resultados que los pacientes más mayores. Concretamente se ha publicado un peor resultado funcional y mayores déficits visuales en este grupo de pacientes^{27,49-53}. En el

estudio de Ater y col. observaron como los menores de 1 año tenían un riesgo de 3,4 veces más de recaída/progresión que los mayores de esa edad⁵¹. También Laithier y col. identifican a los menores de un año como factor de riesgo para una menor supervivencia libre de progresión⁴⁹. Mirow y col. confirman estos resultados en el ensayo clínico alemán HIT-LGG 1996, donde además asocian estos peores resultados con la presencia de síndrome diencefálico, diseminación y edad menor de 6 meses⁵². En los últimos años, se ha demostrado el papel que tiene la vía RAS/RAF/MAPK en la génesis de los gliomas de bajo grado pediátricos⁵⁴⁻⁵⁷. Un estudio reciente de gliomas de bajo grado pediátricos con localización diencefálica describe que el 32% de los pacientes que portaban la mutación BRAF V600E tenían menos de un año de edad, presentando un peor pronóstico⁵⁸.

1.6.- Estratificación y análisis molecular

Los gliomas de bajo grado pediátricos constituyen un grupo muy variado y heterogéneo de distintos tumores, que sin embargo, en la mayoría de los casos están conducidos por un único iniciador genético, mayoritariamente en la vía MAPK (*"mitogen-activated protein kinases"*)^{59,60}(Figura 1). Esta afirmación es completamente cierta en el caso de los astrocitomas pilocíticos, los cuales en el 100% de los casos presentan una alteración de esta vías^{54,56}.

Los avances recientes en secuenciación genética y perfil de expresión génica han derivado en un mejor entendimiento de las vías moleculares que están presentes en la patogenia de los gliomas⁶¹. Las alteraciones más frecuentes

conocidas hasta el momento son las que implican al gen BRAF, miembro distal de la familia RAF serin-treonina quinasa y un regulador clave de la vía MAPK responsable de controlar la división celular, diferenciación e invasión celular. Entre las alteraciones del gen BRAF, las dos alteraciones mejor descritas son el transcrito de fusión entre el dominio activador de MAPK y KIAA1549⁶² y la mutación BRAF V600E.

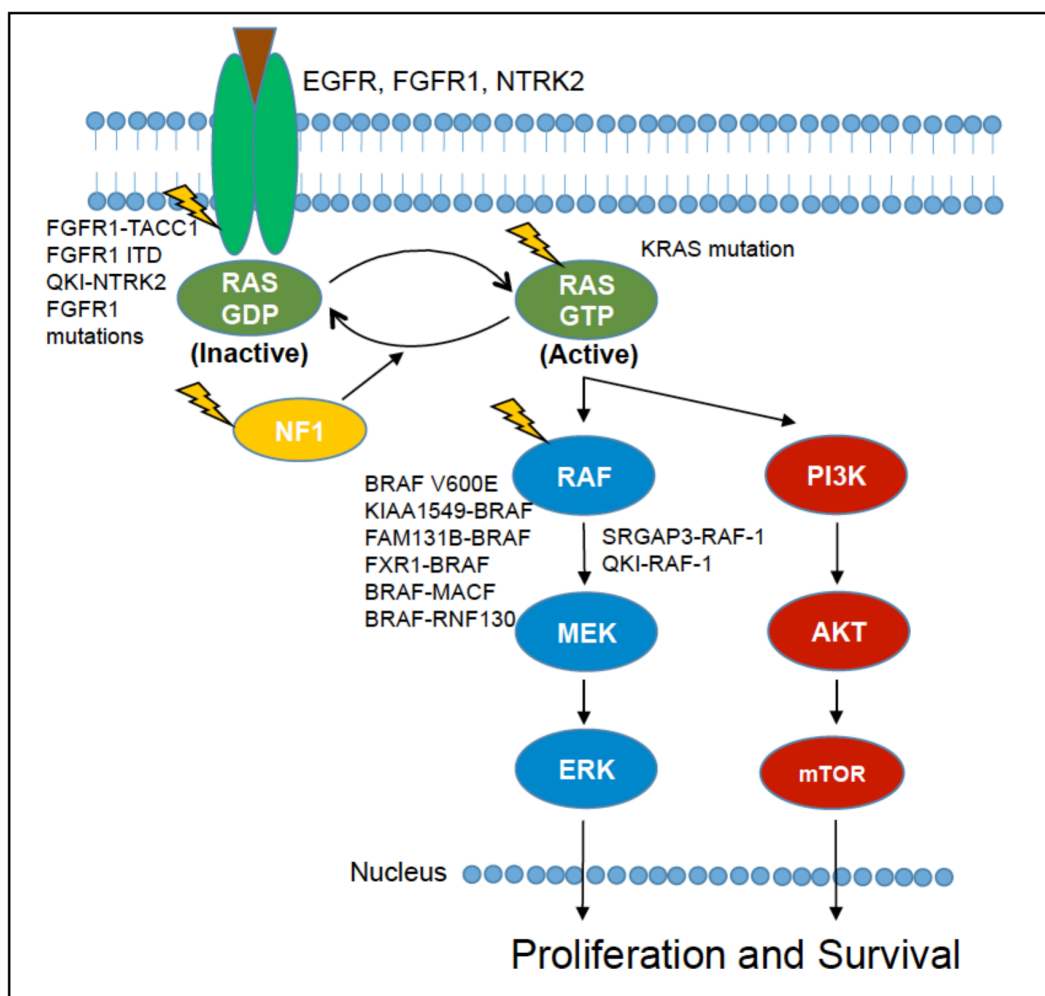


Figura 1. Las vías MAPK y PI3K. (Tomada de Lassaletta A y col. An integrative molecular and genomic analysis of Pediatric hemispheric low-grade gliomas: an update. Childs Nerv Syst 2016; 32(10):1789-97).

1.6.1.- Fusiones BRAF

Varios estudios han sugerido que la presencia de la fusión BRAF:KIAA1549 puede asociar un fenotipo clínico menos agresivo en los gliomas de bajo grado pediátricos y que se asocia a mejor pronóstico⁶³. Así, en el estudio del grupo de Toronto, Hawkins y col. describen un grupo de 70 gliomas pediátricos de bajo grado que definen como clínicamente significativos (localización no cerebelo y resección no completa y seguimiento de más de un año o necesidad de tratamiento quimioterápico). En ellos, demuestran que aquellos con la fusión BRAF:KIAA1549 presentan de forma significativa una mejor supervivencia libre de progresión, independientemente de la edad al diagnóstico, del subtipo histológico y de la localización⁶³.

1.6.2.- Mutaciones BRAF

La mutación BRAF V600E es la resultante de un cambio en la posición 600 del gen BRAF localizado en el cromosoma 7 de una valina por glutamato. Esta mutación fue inicialmente descrita en tumores de adultos como el melanoma, el carcinoma papilar de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal o de ovario y también se ha identificado en otros tumores pediátricos como la histiocitosis de células de Langerhans. La mutación BRAF V600E se sabe también que existe en una pequeña proporción de gliomas de bajo grado pediátricos⁶⁴. Aunque hasta ahora no ha podido ser demostrado, algunos estudios de series pequeñas de casos sugieren que algunos gliomas de bajo grado pediátricos con esta mutación podrían

tener una peor supervivencia libre de recaída o progresión^{58,65}. El grupo de Toronto ya demostró que los gliomas de bajo grado pediátricos que se transforman en gliomas de alto grado (un 2,9% en una cohorte de 886 pacientes) presentaban de forma significativa con más frecuencia la mutación BRAF V600E y la delección CDKN2A⁶⁶.

1.6.3.- Alteraciones en FGFR

Los factores de crecimiento de fibroblastos (*“fibroblast growth factor receptors”*: FGFR) son receptores que se unen a los miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. Tras las mutaciones en BRAF V600E, las siguientes mutaciones en frecuencia en los gliomas de bajo grado son las mutaciones en *FGFR1*. Estas mutaciones suelen afectar al p.N546 o p.K656 de acuerdo a NM_023110. Un nuevo mecanismo en la activación de FGFR1 se observó en gliomas cerebrales con histología de DNET (tumor disembrionárico neuroectodérmico), oligodendrogliomas-like y en algunos astrocitomas pilocíticos^{54,56,67}, en donde se evidenció una duplicación de todo el dominio quinasa (duplicación interna en tándem, FGFR1-ITD, o duplicación del dominio tirosin quinasa, FGFR1 TKD duplicado). Además, se observaron también un pequeño número de fusiones FGFR1:TACC1 y FGFR3:TACC3 (descritas en un 3% de glioblastomas multiformes en adultos⁶⁸) subrayando la importancia de las distintas alteraciones en FGFR1 como director conductor no reconocido hasta ahora de los gliomas de bajo grado^{54,67}.

1.6.4.- Alteraciones en MYB

La proteína del proto-oncogén MYB es un miembro de la familia de factores de transcripción MYB. Las alteraciones de los oncogenes MYB y MYB1 se observan sobre todo en tumores neuroepiteliales de bajo grado. Estas alteraciones se describieron inicialmente en el estudio de secuenciación de tumores realizado por el “Pediatric Cancer Genome Project” (PCGP) y en un análisis independiente enfocado en detectar alteraciones estructurales en astrocitomas difusos grado II y en gliomas angiocéntricos⁵⁷. Estas alteraciones se han confirmado posteriormente en una serie más amplia de tumores neuroepiteliales de bajo grado, en la cual en más del 40% de los astrocitomas difusos grado II y en la mayoría de los gliomas angiocéntricos se observaron alteraciones en MYB⁶⁷. A diferencia de las fusiones típicas de las quinasas, los reordenamientos MYB y MYB1 se caracterizan por la pérdida de la porción C'-terminal (codificando un dominio de regulación negativo) pero con retención de la porción transactivatoria N'-terminal.

1.6.5.- Alteraciones en la familia de NTRK

Además de las fusiones prototípicas de BRAF^{69,70}, ahora que se cuenta con un repertorio mayor de genes 5' asociados^{54,60,71}, se han identificado en los gliomas de bajo grado otras fusiones que implican un receptor tirosin quinasa proximal. *NTRK2* (TrkB) y *NTRK3* (TrkC) se han encontrado reordenados en algunos subtipos histológicos de gliomas de bajo grado, con todas las fusiones reteniendo el dominio quinasa^{54,56}. Además, estas fusiones en la familia NTRK ya se habían

observado en los gliomas de alto grado pediátricos, sobre todo en lactantes⁷², sugiriendo que en algunos casos puede haber solapamiento en la biología de algunos gliomas de bajo y alto grado.

Como conclusión a este apartado de la estratificación biológica de los gliomas de bajo grado podemos afirmar que se están viviendo años de grandes cambios y descubrimientos en la biología de estos tumores. Estos cambios han sido facilitados por el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva que han permitido conocer muchas alteraciones nuevas antes desconocidas. El objetivo actual es determinar cual es el alcance real de estas alteraciones en el diagnóstico y tratamiento de los gliomas de bajo grado en la edad pediátrica. En los próximos años, la integración de la caracterización molecular con la clasificación histológica va a ser determinante para la planificación del tratamiento posterior y con toda seguridad será de gran importancia en el futuro más inmediato. Así se ha demostrado en la nueva clasificación de 2016 de la OMS para los tumores del sistema nervioso central en la que los hallazgos moleculares forman parte ya del diagnóstico de muchos de los subtipos histológicos, incluyendo también los gliomas⁹. Además, al no haber sido demostrado todavía el significado de estas alteraciones moleculares, muchos gliomas pediátricos de bajo grado son tratados todavía sin haber realizado una biopsia diagnóstica que nos permita conocer la biología de estos tumores.

1.7.- Mecanismos moleculares y de resistencia

Desde la identificación de la fusión BRAF:KIAA1549 y de la mutación BRAF V600E en tumores esporádicos^{59,73,74}, se han identificado otras mutaciones y alteraciones en los gliomas de bajo grado pediátricos^{57,75-77}. La mediana de alteraciones somáticas encontradas tras la secuenciación del genoma completo de los gliomas de bajo grado pediátrico ha sido de una⁷⁰, sugiriendo que estas vías de señalización y especialmente la vía RAS/RAF/ERK median de forma directa en la respuesta celular y su regulación durante el crecimiento del niño. Los mediadores de la relación entre el crecimiento normal de la célula y las mutaciones de la vía RAS/RAF/ERK todavía no se conocen con exactitud. La mayoría de los tumores de fosa posterior son astrocitomas pilocíticos y presentan la fusión BRAF:KIAA1549. Todavía se desconoce si su excelente pronóstico se debe a su localización y a su resecabilidad quirúrgica o refleja las características biológicas que aportan esta alteración molecular a esta localización. De manera distinta, la proporción de gliomas de bajo grado en localizaciones distintas al cerebelo, con la fusión BRAF:KIAA1549 es mucho menor^{63,78}. Los gliomas de bajo grado que se localizan en el tronco cerebral, el diencefalo y la corteza cerebral tienen mayor probabilidad de presentar la mutación BRAF V600E⁷⁹, que resulta de la activación de la vía MAPK⁸⁰.

No se conoce aún si la predilección de estas alteraciones moleculares en estos tumores se debe más a la localización o al subtipo celular (astrocitoma pilocítico, xantoastrocitoma pleomórfico, ganglioglioma, etc.). Mientras que la

mayoría de los pacientes incluidos en los actuales ensayos clínicos de terapia dirigida están respondiendo a los tratamientos, algunos no presentan respuesta alguna o progresan de forma muy precoz, mostrando una clara resistencia innata a estos tratamientos. Además, algunos pacientes, tras un periodo de clara respuesta, presentan progresión del tumor, presentando una resistencia adquirida a estos tratamientos⁸¹. Es por todo ello que debemos investigar más los mecanismos que inician y promueven el crecimiento celular de los gliomas de bajo grado, incluyendo los mecanismos de resistencia al tratamiento dirigido.

La resistencia adquirida a la inhibición de la vía MAPK en el tratamiento del melanoma es un fenómeno conocido y se desarrolla por varios mecanismos que incluyen amplificación de RTK, mutaciones de RAS y la selección de una secuencia alternativa de BRAF^{82,83}. En el melanoma con mutación BRAF se produce de manera precoz una resistencia adquirida debido a la activación de vías alternativas a la vía MAPK⁸⁴. Estas vías alternativas incluyen activación de CRAF, activación de RTK, actividad de IGF1/PI3K y mutaciones en NF1 y MEK1. Las mutaciones secundarias en BRAF no se han visto involucradas como mecanismos de resistencia en los melanomas pero todavía no se han estudiado de forma reglada en los gliomas de bajo grado pediátricos. La resistencia innata se cree que puede ser debida a mutaciones fuera de la vía MAPK o a mutaciones cooperativas secundarias como la metilación del promotor PTEN⁸⁵ además de una alteración en la vía MAPK, desarrollando así tumores no sensibles al tratamiento con un inhibidor de la vía MAPK pero que podrían ser sensibles al tratamiento combinado con dos inhibidores que desarrollaran su actividad en distintas localizaciones de la

vía MAPK (por ejemplo un inhibidor de MEK y un inhibidor de BRAF V600E). Estudios recientes han demostrado mutaciones proximales en los gliomas de bajo grado pediátricos incluyendo FGFR1 y NTRK2⁵⁶. Mientras que estos receptores de las tirosin quinasas activarían la vía MAPK, vías paralelas como STAT o PIK3 se activarían⁸⁶, sugiriendo que a lo mejor utilizando inhibidores de estos receptores de tirosin quinasas podrían mostrar una eficacia mayor en estas situaciones. Se necesitan más estudios de estas mutaciones y nuevos fármacos que dirijan su mecanismo de acción sobre ellos.

Basados en estos mecanismos de resistencia se han propuesto tratamientos combinados para los tumores que presentan la mutación BRAF V600E. La primera estrategia usada ha sido combinar un inhibidor de la mutación BRAF V600E con un inhibidor de MEK. Basado en la evidencia demostrada en la tasa de respuesta y en la duración de la misma, la FDA aprobó esta combinación en el tratamiento del melanoma⁸⁷. De momento, la efectividad del tratamiento de los gliomas de bajo grado en la edad pediátrica está por demostrar y solo existen algunos casos aislados publicados de resistencia adquirida. Levy y cols. publicaron un caso de un paciente pediátrico con un glioma de bajo grado con mutación BRAF V600E que se trató con vemurafenib y vinblastina. El paciente respondió y posteriormente progresó a los 9 meses de haberse iniciado el tratamiento. En el momento de la progresión los autores demostraron que el paciente había adquirido la resistencia debido a la sobre-expresión de la autofagia (un mecanismo celular conocido frente al estrés)⁸⁸. A través de estudios preclínicos, los autores demostraron que

inhibiendo el fenómeno de la autofagia con cloroquina podían resensibilizar el tumor al vemurafenib y el paciente obtuvo de nuevo respuesta al mismo.

Aunque existe un déficit claro de modelos preclínicos de gliomas de bajo grado, existen diferentes modelos preclínicos de gliomas de alto grado con la mutación BRAF V600E. Yao y col. mostraron que estos tumores son inicialmente sensibles al vemurafenib en vitro y en vivo, sin embargo, desarrollan resistencia mediante activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁸⁹. Algunos receptores de tirosin quinasas como EGFR se re-expresan a través de un mecanismo de retroalimentación negativo que se produce en los gliomas de bajo grado pediátricos distal a MEK, pero la inhibición de BRAF o de MEK disminuye esta retroalimentación negativa, haciendo que los receptores de tirosin quinasas activen otra vez las vías de forma paralela. Estos autores demostraron como combinando un inhibidor de BRAF y un inhibidor de EGFR se aumentaba la actividad antitumoral de forma significativa⁸⁹.

Mientras en los últimos años la disregulación de la señal RAS/RAF ha sido el foco primario de la investigación de la biología de los gliomas de bajo grado pediátricos, también se han identificado otras alteraciones genéticas en otros subgrupos de pacientes. Estas alteraciones identificadas incluyen la duplicación del dominio tirosin quinasa del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR1) y los reordenamientos de MYB y BYBL1^{54,56,57,77}. Las alteraciones en el gen FGFR1 también incluyen fusiones con genes TACC que inducen la sobre-expresión de las vías RAS/RAF/ERK y PI3K. El gen MYB controla un gran número de genes distales,

sin embargo el mecanismo por el cual se produce la oncogénesis en algunos de estos subtipos de gliomas de bajo grado se desconoce. Estudios recientes en los gliomas angiocéntricos han demostrado tres activaciones simultáneas de las vías de señalización afectadas por MYB:QKI que han ampliado la posibilidad de conocer los mecanismos implicados en esta oncogénesis⁷⁷. Las alteraciones en MYB y en FGFR1 se observan más frecuentemente en astrocitomas difusos y de manera excepcional en astrocitomas pilocíticos⁵⁴. Nuevos estudios demuestran que la supervivencia para estos pacientes podría ser menor que para los gliomas de bajo grado con alteraciones en BRAF, por lo que se hace necesario el desarrollo de tratamientos dirigidos para estos subgrupos de tumores. Algunos inhibidores de MYB se han evaluado en fase de investigación precoz en el contexto de tumores hematológicos sin evidenciarse una clara especificidad y están todavía lejos de utilizarse en ensayos clínicos^{54,57,77,90}. Se ha sugerido que los oncogenes MYB podrían activar la vía MAPK. Aunque esto no se ha demostrado todavía, podría significar que la misma combinación de inhibidores de MEK utilizada en los tumores con mutación de BRAF se podrían combinar en el futuro para los tumores con alteración de MYB con fármacos que inhiben o alteran la función de los factores de transcripción, como son los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) o los inhibidores de BET (bromodomain and extra-terminal).

Todavía está por demostrar si la mutación BRAF V600E o las mutaciones en FGFR1 están implicadas en la resistencia a la quimioterapia convencional y/o a la radioterapia^{91,92}. La delección o el silenciamiento del locus p16INK4a podría permitir a los gliomas de bajo grado pediátricos desviar la senescencia inducida por oncogenes, observada cuando hay altos niveles de activación de la vía

MAPK/ERK^{64,93} y este podría ser un marcador de gran valor para identificar aquellos gliomas de bajo grado con tendencia a ser resistentes al tratamiento y por lo tanto a la progresión. Células similares a las pluripotenciales (“stem-like”) se han identificado en gliomas de bajo grado pediátricos, y con mucha probabilidad juegan un papel muy importante en la remisión o en la progresión de muchos de estos tumores⁹⁴. El problema es que hasta la fecha no existe ninguna serie amplia de gliomas de bajo grado pediátricos que hayan progresado en los que se haya realizado la caracterización molecular, con lo que todavía se desconocen con exactitud los mecanismos de resistencia a los tratamientos convencionales. Además, a diferencia de otras neoplasias, el hecho de que estos tumores progresen, no siempre significa que se hagan resistentes a los tratamientos, de hecho hay casos descritos en la literatura en los que estos tumores vuelven a responder al mismo tratamiento⁹⁵. Aunque algunos gliomas de bajo grado pediátricos tienen tendencia a progresar de forma reiterada, la mayoría de los pacientes son supervivientes a largo plazo, pues llega un momento (sobre todo al llegar los pacientes a la segunda década de la vida) en el que estos tumores desarrollan quiescencia y dejan de crecer para siempre^{96,97}. La evidencia de por qué algunos tumores progresan y otros no, de por qué algunos se hacen resistentes al tratamiento y otros no, y de por qué algunos pacientes entran en quiescencia y otros no, se hace fundamental para en el futuro poder planificar el tratamiento de estos pacientes y así evitar los efectos secundarios del mismo.

Mientras se desarrollan actualmente los ensayos fase I y II con agentes dirigidos a dianas moleculares en monoterapia, es preciso mirar hacia el futuro y

empezar a desarrollar nuevos ensayos con tratamientos moleculares combinados. Es preciso empezar a obtener datos de ensayos que podrían incluir la combinación de tratamiento molecularmente dirigido con quimioterapias convencionales, o con otros tratamientos dirigidos o en aquellos tumores quimioresistentes con radioterapia como parte de ensayos fase I o II. Algunos estudios han sugerido que la proteína anormal de fusión BRAF:KIAA1549 regula el crecimiento celular de los gliomas de bajo grado pediátricos de una manera mTOR dependiente^{98,99}. Estudios preclínicos han demostrado que los tratamientos en combinación con inhibidores específicos de BRAF V600E (PLX4720), inhibidores de mTOR (everolimus) o inhibidores de MEK (AZD6244) son superiores en actividad a la monoterapia para aquellos gliomas con la mutación BRAF V600E o sin ella. Además aquellas células tumorales con la fusión BRAF:KIAA1549 eran altamente sensibles a la inhibición de MEK1 y 2 y el tratamiento combinado también era superior (aunque sólo moderadamente) al tratamiento en monoterapia^{100,101}.

Basándonos en modelos preclínicos, el tratamiento combinado BRAF/MEK también parece que sería efectivo en gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E de subtipos histológicos que clásicamente han sido resistentes al tratamiento quimioterápico como el ganglioglioma o el xantoastrocitoma pleomórfico (PXA). Recientemente se han propuesto estrategias para hacer frente a la resistencia inicial de tumores con la mutación BRAF V600E al tratamiento dirigido. Estas incluirían el uso de un inhibidor general de BRAF (inhibidor pan-RAF) en combinación con inhibidores de MEK (RAF/MEK), como ya se han demostrado efectivos en líneas celulares de cáncer de colon BRAF V600E

mutadas¹⁰². Estas combinaciones podrían tener mayor sinergia que las vistas con los inhibidores de BRAF/MEK, y podrían ser una elección más razonable para el tratamiento de gliomas de bajo grado pediátricos con resistencia inicial a los tratamientos. Otras combinaciones en estudio incluyen inhibidores de BRAF con inhibidores de IGFR1 y otras combinaciones con inmunoterapia. Esta última, aunque muy prometedora, se ha visto de mayor relevancia en aquellos tumores con alteraciones genómicas complejas, algo nada característico de los gliomas de bajo grado pediátricos, haciendo que estas combinaciones no sean la prioridad en la investigación actual¹⁰³.

Los tratamientos de combinación que utilizan quimioterapias (o radioterapia) convencionales y fármacos de acción molecular dirigidos, serían más apropiados para el tratamiento de aquellos gliomas de bajo grado pediátricos con mutaciones directoras o patogénicas que incluyen la BRAF:K1A1549, FGFR, o de los receptores NTRK. Tratamientos específicos para estas alteraciones ya han demostrado respuestas prometedoras en otros tumores, aunque con el problema de la resistencia adquirida precoz. La inactivación distal de las vías MAPK y PI3K podría ser una buena estrategia. Dados los efectos secundarios de la quimioterapia convencional, quizá tendría sentido desarrollar nuevos ensayos clínicos en los que se ofreciera el tratamiento combinado con agentes molecularmente dirigidos, y si se desarrollaran resistencias, entonces administrar un tratamiento combinado con una quimioterapia convencional.

1.8.- Tratamiento quirúrgico en los gliomas de bajo grado pediátricos

La cirugía es el tratamiento de elección y casi siempre curativa en los gliomas de bajo grado pediátricos localizados en los hemisferios cerebrales o en el cerebelo. Cuando la localización de estos tumores limita la posibilidad de realizar resecciones completas o casi completas, entonces es cuando hay que considerar otros tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia, sobre todo cuando el tumor muestra un comportamiento agresivo produciendo sintomatología a los pacientes o cuando se aprecia una progresión clara radiológica.

En aquellos casos con indicación quirúrgica, la estrategia preoperatoria de los pacientes puede ser conservadora, si los pacientes están asintomáticos, porque se les haya descubierto el glioma de forma incidental y se puede hacer una cirugía programada o puede requerir una intervención urgente por una localización que produzca una hidrocefalia obstructiva. Los pacientes con letargia, coma e inestabilidad cardiorrespiratoria precisarán de una intervención urgente con un drenaje ventricular externo que solucione de inmediato la hidrocefalia. En pacientes con síntomas más subagudos, se puede, si la localización del tumor lo indica (por ejemplo en una localización en fosa posterior), considerar la ventriculocisternostomía del tercer ventrículo endoscópica. Este procedimiento, aunque no siempre exitoso, puede evitar la colocación de una válvula ventrículo-peritoneal permanente. En gliomas de bajo grado de cerebelo, la necesidad de una derivación permanente tras la resección tumoral se estima que es del 10 al 40% de los casos¹⁰⁴.

El tratamiento de elección en los astrocitomas cerebelosos es la resección completa, que se obtiene en el 60-80% de los casos quirúrgicos¹⁰⁵. La resección completa se define como que todo el tumor visible por el neurocirujano es extraído durante la cirugía y la RM postquirúrgica confirma que no se aprecian restos tumorales en el lecho tumoral. La RM postoperatoria se recomienda realizarla a las 24-48 horas después de la cirugía, porque los cambios postquirúrgicos en forma de gliosis y edema comienzan a aparecer entre 3 y 5 días después de la cirugía y pueden interferir con la identificación de tumor residual. Los tumores clásicos quísticos con un nódulo en la pared del quiste pueden requerir la exclusiva resección del nódulo para conseguir una resección completa. Todo depende de la composición de la pared del quiste. Si la pared del quiste no presenta captación de contraste en la RM, no hace falta reseccionar el quiste. Si la pared del quiste presenta captación de contraste en la RM, entonces se suele recomendar la resección de todas las áreas captantes para prevenir la recaída/progresión del tumor. Aun así, recientemente se ha evidenciado que la captación de contraste por la pared del quiste puede representar la vascularización de la gliosis reactiva y que en este caso no estaría recomendada la exéresis quirúrgica del quiste¹⁰⁶. La resección parcial está indicada cuando exista riesgo con la resección completa de producir morbilidad importante y/o disfunción neurológica significativa. Esto se produce sobre todo cuando hay invasión del tronco cerebral, invasión del suelo del cuarto ventrículo, diseminación leptomeningea o metástasis.

En resumen, la cirugía sigue siendo un pilar fundamental en el tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos. La resección completa de estos tumores

viene determinada por la localización del tumor, y cuando se obtiene, alcanza cifras de supervivencia libre de progresión y supervivencia global a los 10 años de más del 90%¹⁰⁷. Un estudio de más de 4000 pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado no evidenció diferencias entre pacientes que obtuvieron una resección completa y aquellos que presentaban residuo tumoral⁹⁶. Además, las cirugías repetidas para obtener una resección completa se asocian a un aumento del riesgo de presentar disfunción neurológica permanente y una calidad de vida pobre¹⁰⁸. A la hora de tomar decisiones en estos pacientes, es importante siempre valorar el riesgo de los daños neurológicos permanentes. Dados los buenos resultados a largo plazo, resecciones menos agresivas deben ser valoradas entre los neurocirujanos en caso de riesgo de estas secuelas, que disminuyen la calidad de vida futura de estos pacientes. Las localizaciones en la línea media como las vías ópticas, el hipotálamo, el tálamo y el tronco cerebral deben contraindicar el intento de resección dado el riesgo de complicaciones, y la cirugía sólo se realizará para la obtención de una biopsia lo suficientemente amplia para el estudio diagnóstico y molecular.

1.9.- Tratamiento radioterápico en los gliomas de bajo grado pediátricos

Hasta hace pocos años, la radioterapia ha sido el tratamiento de elección en aquellos pacientes pediátricos mayores de 5-10 años con gliomas de bajo grado que precisaban de tratamiento adyuvante después o no de la cirugía. El papel de la radioterapia en el tratamiento de estos tumores en cuanto a la supervivencia no está claro. Existen muy buenos resultados en el control local del tumor con

supervivencias libres de progresión a 5 y 10 años del 87% y 74% respectivamente utilizando radioterapia conformacional¹⁰⁹, aunque la radioterapia no ha demostrado aumentar de forma significativa la supervivencia global de estos pacientes^{110,111}. Existen dos grandes estudios recientes que incluso sugieren que aquellos pacientes que recibieron radioterapia para el tratamiento de sus gliomas de bajo grado cuando eran niños, tienen a largo plazo una mayor probabilidad de fallecer que los que no habían recibido radioterapia. El primero es una revisión del registro norteamericano de cáncer SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) que incluye 4.040 pacientes pediátricos diagnosticados con gliomas de bajo grado entre los años 1973 y 2008. En el análisis univariante se identificaron como factores de riesgo de fallecer el año en el que se administró el tratamiento (más antiguo más riesgo), la edad al diagnóstico (edad menor peor), la histología y el grado de la OMS (grado II peor), la localización, el hecho de haber recibido radioterapia como tratamiento y la resección quirúrgica inicial. En el análisis multivariante el factor de riesgo más importante era el haber recibido radioterapia como tratamiento con una probabilidad de fallecer debido al glioma de 3,9 veces mayor que aquellos que no habían recibido radioterapia. Cuando se comparaba la supervivencia global en aquellos pacientes que no habían recibido radioterapia con aquellos que si habían recibido radioterapia como tratamiento para su glioma de bajo grado, la supervivencia era significativamente mayor en aquellos que no habían recibido radioterapia independientemente del grado de resección quirúrgica alcanzado⁹⁶. El segundo estudio es una revisión también retrospectiva del grupo de Toronto de 1202 pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. Con una mediana de seguimiento de 12,7 años, el haber recibido radioterapia

como tratamiento para el tumor se asociaba a una probabilidad 3 veces mayor de fallecer por todas las causas y a una probabilidad 4 veces mayor de fallecer en relación con el tumor⁹⁷. Probablemente la radioterapia obtenga mejores resultados que la quimioterapia como tratamiento para el control local de los tumores irresecables que precisen de un tratamiento adicional. El problema es la morbilidad a largo plazo que incluye vasculopatía, alteraciones del crecimiento y otras alteraciones endocrinológicas, riesgo de segundos tumores y déficits cognitivos especialmente en los niños más pequeños y en los pacientes con neurofibromatosis¹¹²⁻¹¹⁵. La radioterapia de intensidad modulada (IMRT) y la radioterapia estereotáxica son procedimientos relativamente nuevos que pueden disminuir el riesgo de secuelas a largo plazo. Un estudio con 160 pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado que fueron tratados con braquiterapia estereotáxica con implantación de Iodo-125 demostró una SLP y SG del 92 y 93% respectivamente¹¹⁶. Otros avances como la radioterapia con protones, que disminuye la radiación alrededor de la zona terapéutica en comparación con los fotones, puede también disminuir estos efectos secundarios a largo plazo en el futuro¹¹⁷⁻¹¹⁹.

1.10.- Tratamiento quimioterápico en los gliomas de bajo grado pediátricos

En las últimas tres décadas, se han intensificado los esfuerzos por demostrar el papel de la quimioterapia en niños con gliomas de bajo grado, tanto de nuevo diagnóstico como tras la progresión clínica o radiológica. Se han realizado múltiples estudios y ensayos clínicos prospectivos con diferentes

quimioterapias, en combinación o en monoterapia en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado de nuevo diagnóstico o en progresión o refractariedad. La mayoría de estos estudios han demostrado respuestas o estabilización de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, permitiendo que la radioterapia se pudiera posponer o evitar^{24,51,120-124}. Sin embargo, la importancia clínica de la reducción transitoria del tumor y cómo se traduce esta información en la mejoría de los resultados a largo plazo todavía está por demostrar. El ensayo clínico del Children's Oncology Group A9952 fue un estudio prospectivo en pacientes menores de 10 años realizado durante los años 1997 a 2005⁵¹. La anatomía patológica de los pacientes biopsiados reclutados (sin NF-1) incluía astrocitomas pilocíticos en 124 pacientes (45%), astrocitoma fibrilar de bajo grado en 28 pacientes (10%) y LGG NOS (no especificado) en 27 pacientes (10%). Los pacientes sin NF-1 se randomizaron a recibir vincristina + carboplatino (VC=137 pacientes) o procarbina + CCNU + tioguanina + vincristina (PTCV=137 pacientes). La supervivencia libre de eventos fue del 39±4% para los pacientes que recibieron CV y 52±5% para los pacientes que recibieron TPCV; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0,10). Los factores pronósticos que se observaron para la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos fueron la menor edad al diagnóstico y el tamaño del tumor (>3 cm²). Además, los pacientes con tumores talámicos tuvieron una peor supervivencia global. A continuación, el COG desarrolló el estudio ACNS0223, investigando la adición de temozolomida a la combinación de vincristina + carboplatino en pacientes pediátricos menores de 10 años con gliomas de bajo grado de nuevo diagnóstico entre los años 2004 y 2007¹²⁵. En los 65 pacientes que se incluyeron en este

estudio, la histología más frecuente fue el astrocitoma pilocítico (n=41, 63%) y la localización más frecuente fue el hipotálamo-quiasma óptico (n=15, 23%). La supervivencia libre de eventos a los 5 años fue del 46% (95% CI: 33-58%) y la supervivencia global a los 5 años del 87% (95% CI: 75-93%).

El comité europeo para los tumores cerebrales de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) coordinó un estudio europeo multicéntrico para el tratamiento de niños y adolescentes con LGG, el protocolo SIOP LGG-2004. Fue un estudio randomizado para pacientes de nuevo diagnóstico que no estuvieran diagnosticados de NF-1, con LGG irresecables en progresión o sintomáticos para investigar el papel de la intensificación de la quimioterapia. En el estudio, el tratamiento estándar de vincristina + carboplatino se randomizó frente a un tratamiento más intensivo añadiendo etopósido a la combinación (vincristina + carboplatino + etopósido). Se incluyeron 497 pacientes y no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa ni en la respuesta radiológica a las 24 semanas, ni en la supervivencia libre de evento o la supervivencia global a los 5 años. La conclusión más importante de este estudio fue que el añadir etopósido a la combinación estándar no tuvo un impacto en la respuesta o la supervivencia, y no mejoró los resultados en pacientes con factores de riesgo clínicos¹²⁶.

Con todo lo citado anteriormente, la combinación de vincristina y carboplatino se acepta de forma universal como el tratamiento estándar de primera línea para los pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado que requieren tratamiento quimioterápico. En esta combinación, el carboplatino se

puede administrar de forma mensual (estrategia SIOP) o de forma semanal (estrategia COG) durante un periodo de 52 a 84 semanas. Las dos opciones han demostrado que la radioterapia se puede diferir u omitir en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, los dos regímenes de tratamiento son claramente deficitarios en términos de progresión libre de enfermedad y en la toxicidad. La progresión libre de enfermedad durante y tras el tratamiento quimioterápico es alta y a los 5 años, menos del 40% de los pacientes tienen un control adecuado del tumor. Además, algunos pacientes no pueden tolerar el protocolo completo del tratamiento debido a la incidencia excesiva de reacciones alérgicas al carboplatino (hasta el 32% en algunos estudios prospectivos¹²⁴) que es la responsable del cese precoz del tratamiento o de la sustitución del carboplatino por quimioterapia con mayor toxicidad para los pacientes, como el cisplatino y la ciclofosfamida.

Otras combinaciones de quimioterápicos para el tratamiento de los gliomas de bajo grado en la edad pediátrica han presentado buenos resultados en cuanto al control de la enfermedad, pero con toxicidades demasiado costosas para los pacientes, teniendo en cuenta que hablamos de tumores que en la mayoría de los casos no van a producir la muerte del paciente y que el objetivo de los tratamientos es no solo controlar la enfermedad sino minimizar al máximo los efectos secundarios de los mismos. Por ejemplo, el régimen citado anteriormente con TPCV (tioguanina, procarbicina, lomustina y vincristina) se asocia con toxicidad hematológica significativa, además de un riesgo potencial de desarrollar infertilidad y segundos tumores en relación al uso de lomustina y procarbicina^{127,128}. La combinación utilizada por la Sociedad Francesa de

Oncología Pediátrica (SFOP) utilizando 6 fármacos (cisplatino, etopósido, ciclofosfamida, procarbamina, vincristina y carboplatino) presentaba múltiples riesgos de efectos secundarios a largo plazo⁴⁹. La combinación de etopósido y cisplatino utilizado por el grupo italiano de Milán se asocia a una incidencia elevada de pérdida de audición secundaria al uso de cisplatino y al riesgo de leucemia secundaria por el uso del etopósido^{123,129}. La pérdida de audición en pacientes con gliomas del nervio óptico los cuales presentan déficits de agudeza visual con frecuencia puede conllevar situaciones muy limitantes para los pacientes. Finalmente, la utilización de temozolomida puede conllevar riesgo de segundos tumores a largo plazo¹³⁰.

Existen otros fármacos que se han estudiado como alternativas a la combinación estándar de los regímenes basados en el carboplatino. La vinblastina semanal a una dosis de 6 mg/m² fue estudiada por el grupo de Toronto en gliomas de bajo grado pediátricos que habían presentado progresión tras una o más líneas de tratamiento quimioterápico o tras radioterapia^{25,28}. Inicialmente, la vinblastina semanal se utilizó en un estudio piloto en 11 pacientes que progresaron a pesar del tratamiento con vincristina y carboplatino, y que no fueron candidatos al tratamiento con radioterapia. Este estudio piloto demostró una reducción significativa del volumen tumoral en 6 pacientes con mínima toxicidad hematológica²⁸. Este estudio se continuó con un ensayo multicéntrico fase 2 en el que se incluyeron 51 pacientes. Los pacientes eran candidatos a entrar en el estudio si habían progresado a una o más líneas de tratamiento previas (incluida la radioterapia). La vinblastina se administró a una dosis de 6 mg/m² semanal

durante 54 semanas. El 75% de los pacientes completaron el año del tratamiento. Se demostró una tasa de respuesta del 33%, pero lo que es más importante, el tratamiento fue muy bien tolerado y la supervivencia libre de progresión fue del $42,3 \pm 7,2\%$, en la línea de otras quimioterapias convencionales²⁵. En otra publicación posterior también del grupo de Toronto, se describió la utilización de vinblastina semanal en 9 pacientes que habían suspendido el tratamiento con vincristina y carboplatino debido a la reacción alérgica derivada del uso de carboplatino. Todos los pacientes completaron el tratamiento con vinblastina y se observó respuesta (definida como no progresión) en 7 de los 9 pacientes¹³¹. La toxicidad de la vinblastina fue muy leve y ningún paciente precisó de transfusiones de plaquetas o concentrado de hematíes.

Los resultados esperanzadores en el tratamiento de adultos con LGG con temozolomida en monoterapia no se han traducido al ámbito pediátrico¹³². En el estudio fase 1 del Cancer Children Group, tan sólo uno de los 20 pacientes presentó una respuesta parcial¹³³. En el estudio fase 2 de Gururangan y col. se incluyeron 30 pacientes con una mediana de edad de 10 años. Se les administró temozolomida a una dosis de $200 \text{ mg/m}^2/\text{día} \times 5 \text{ días}$ cada 28 días. Recibieron una mediana de 9 ciclos. Los mejores resultados se obtuvieron en aquellos pacientes con astrocitomas pilocíticos y gliomas de vías ópticas en los que la supervivencia libre de progresión fue del 49% a los 2 años (seguimiento corto)¹³⁴. En otra serie pequeña de 13 pacientes (9 con astrocitomas pilocíticos) la supervivencia libre de eventos a los 3 años fue del 57%¹³⁵. Con estos resultados, el riesgo de desarrollar segundos tumores (sobre todo en pacientes con neurofibromatosis) y la toxicidad

hematológica de la temozolomida, hacen que este régimen sea poco utilizado entre los neuro-oncólogos pediátricos para el tratamiento de los gliomas de bajo grado.

El “North American Pediatric Brain Tumor Consortium” (PBTC) que desarrolla ensayos clínicos fase 1 y fase 2 en tumores cerebrales pediátricos con nuevos tratamientos ha desarrollado distintos estudios en gliomas de bajo grado pediátricos. El estudio PBTC-018, un fase 1 del CC-5013 (lenalidomida) en pacientes pediátricos con tumores del SNC refractarios a tratamientos convencionales, sugirió algo de actividad en LGG pediátricos y sobre todo una enfermedad libre de progresión a los 12 meses del $67\pm 13\%$ ¹³⁶. Este ensayo fue el prelude del ensayo clínico del COG fase 2 actual, que está activo, en el que se estudia la actividad de la lenalidomida en gliomas del nervio óptico y astrocitomas pilocíticos pediátricos en dos niveles de dosis diferentes (clinicaltrials.gov: NCT01553149).

El estudio PBTC-022 evaluó la combinación de bevacizumab e irinotecan en distintos tumores cerebrales pediátricos²⁹. En el estrato de los gliomas de bajo grado, se analizaron la tasa de respuesta, la estabilización de la enfermedad (más de 6 meses con enfermedad estable) y la enfermedad libre de progresión¹³⁷. De los 35 pacientes evaluables, la supervivencia libre de progresión a los 6 meses y a los 2 años fue del 85,4% y 47,8% respectivamente. Sólo hubo dos pacientes con respuestas parciales mantenidas, sin embargo, el 80% de los pacientes que habían sido refractarios a tratamientos convencionales previos presentaron enfermedad estable. La toxicidad de la combinación fue considerada tolerable y muchos

especialistas han añadido esta combinación al tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos³⁰. Además, ha habido alguna experiencia más con un número limitado de pacientes en los que se sugiere que el bevacizumab en monoterapia podría ralentizar o mejorar la pérdida de la visión en pacientes pediátricos con gliomas de vías ópticas en progresión con deterioro visual^{30,138}. El verdadero papel del bevacizumab en los gliomas de bajo grado pediátricos lo conoceremos cuando conozcamos los resultados del ensayo clínico multicéntrico que está desarrollando el grupo de Toronto en el que se está randomizando vinblastina en monoterapia frente a vinblastina + bevacizumab en combinación en gliomas de bajo grado pediátricos de nuevo diagnóstico.

Todos los estudios completados en gliomas de bajo grado en pacientes pediátricos nos han dado una información de gran valor y han demostrado que hay un claro papel de la quimioterapia, y en casos muy específicos de la radioterapia en pacientes con gliomas de bajo grado al diagnóstico o en la progresión tras el tratamiento inicial. Sin embargo, estos estudios no han demostrado que haya un régimen de quimioterapia claramente mejor que el resto y todos los regímenes tienen una eficacia similar con más o menos toxicidad de las quimioterapias utilizadas. El tratamiento con quimioterapia todavía está lejos de ser un tratamiento eficaz y lo que permite es estabilizar la enfermedad en aproximadamente la mitad de los pacientes, mientras el tumor entra en un estado de senescencia.

Se sabe que con la administración de quimioterapia, independientemente del régimen utilizado, aproximadamente el 50% de los pacientes requerirá una segunda línea de quimioterapia. El grupo de Toronto realizó un estudio prospectivo en 38 pacientes que precisaron una segunda línea de quimioterapia después de progresión tras la primera línea de quimioterapia¹³⁹. El 92% de los pacientes completaron la segunda línea de tratamiento y la toxicidad fue comparable a la primera línea. La supervivencia libre de progresión y la supervivencia global a los 5 años fueron de $86\pm 6\%$ y $37\pm 8\%$ respectivamente, sin diferencias significativas cuando se compararon con la SLP y SG de la primera línea de tratamiento. Con este estudio y otros posteriores podemos concluir que la administración de varias líneas de quimioterapia en pacientes con gliomas de bajo grado no aumenta la morbi-mortalidad y puede ser factible para retrasar o evitar el uso de la radioterapia por sus conocidas secuelas a medio y largo plazo.

1.11.- Transición de los protocolos con quimioterapia convencional a tratamientos molecularmente dirigidos en los gliomas de bajo grado pediátricos

Los gliomas de bajo grado pediátricos reúnen unas características ideales para administrar tratamientos molecularmente dirigidos. Hay que recordar en este punto, que todavía la medicina personalizada tiene que demostrar como cambia el pronóstico de estos pacientes. Contamos con medicamentos específicos para muchas de las vías moleculares implicadas, sin embargo, no existen todavía suficientes estudios con seguimiento suficiente para cada una de las dianas

moleculares y no hay todavía ensayos clínicos que estudien el importante apartado de las resistencias a estos fármacos.

El próximo protocolo de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) para gliomas de bajo grado pediátrico, quiere ser diseñado como un ensayo clínico fase III, en el cual se randomicen dos tipos de quimioterapia convencional (vincristina + carboplatino vs. vinblastina), dos duraciones del tratamiento (18 meses vs. 24 meses) y además la propuesta es tener un tercer brazo de tratamiento experimental con un inhibidor de MEK. Para entrar en el ensayo, será obligatorio la obtención de tejido tumoral del paciente y que se realice una revisión central de la histología así como un estudio molecular del tumor. Este próximo protocolo SIOP demuestra el avance vertiginoso que se está produciendo en el conocimiento de la biología molecular de los gliomas de bajo grado pediátrico y traduce la gran expectación que presenta ahora mismo el tratamiento dirigido a nivel molecular.

Ya existen estudios que están investigando la eficacia de los inhibidores de las vías mTOR y BRAF como agentes únicos en gliomas de bajo grado pediátricos que progresan a pesar del tratamiento convencional¹⁴⁰. Veintitrés pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado se trataron con everolimus tras progresar después de recibir tratamiento convencional con un régimen de quimioterapia que incluía carboplatino. El resultado fue de 4 respuestas parciales, 13 enfermedades estables y 6 progresiones. Los pacientes no presentaron toxicidad significativa¹⁴¹. Para entrar en este ensayo, no se requirieron muestras de tejido. Es por ello que actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico para determinar

si el marcador de activación de la vía PI3K: phospho-S6 es un buen biomarcador para la respuesta al tratamiento (NCT01734512).

Recientemente se han publicado los resultados del ensayo clínico PBTC-029 del Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) norteamericano en el cual se estudiaba la seguridad y eficacia del selumetinib (inhibidor de MEK 1/2) en gliomas de bajo grado pediátricos que habían sido refractarios o presentaban recaída tras tratamiento convencional. Los resultados son muy prometedores con una supervivencia libre de progresión del $69 \pm 9,8\%$ a los dos años y presentando el 50% de los pacientes, una reducción del tamaño del tumor en la secuencia FLAIR de más del 25%. La toxicidad más frecuente fue mucositis y exantema³³.

Los inhibidores de primera generación de la mutación BRAF V600E como el dabrafenib y el vemurafenib, han demostrado resultados excelentes en el tratamiento de pacientes con melanoma que presentan la mutación BRAF V600E^{142,143}. Para pacientes con gliomas de bajo grado resistentes al tratamiento convencional que además presentaban la mutación BRAF V600E, los resultados preliminares con dabrafenib son esperanzadores, asociándose en el estudio multicéntrico fase I (pendiente de publicación definitiva), con 8 respuestas parciales y 6 enfermedades estables de 15 pacientes del estudio¹⁴⁴. Los inhibidores de BRAF de la generación anterior, como el sorafenib, no tienen eficacia e incluso pueden acelerar el crecimiento de los tumores en presencia de la fusión BRAF:KIAA1549 o en ausencia de NF-1, como se evidenció con el cierre temprano del ensayo clínico del sorafenib en gliomas pediátricos de bajo grado¹⁴⁵. Estudios

preclínicos sugirieron que el crecimiento tumoral acelerado en estos casos era secundario a la activación paradójica de los dímeros de RAF por el sorafenib¹⁴⁶.

La inmunoterapia en los tumores cerebrales se está desarrollando también de forma vertiginosa. La inmunoterapia utiliza el propio sistema inmune del paciente contra las células tumorales. Actualmente existen tres tipos de inmunoterapia contra el cáncer: las vacunas, las terapias celulares adoptadas y la modulación de los puntos de control inmunes. Las vacunas se han ensayado sobre todo en los gliomas difusos de tronco (DIPG) pero todavía no tenemos resultados concluyentes. Las terapias celulares consisten en la sensibilización en el laboratorio de linfocitos T del paciente frente a proteínas tumorales diana. Estos linfocitos se infunden posteriormente en el paciente con el objetivo de desarrollar una respuesta activa del sistema inmune frente al tumor. Uno de los tipos de terapia celular, los CAR (chimeric antigen receptor) están dando buenos resultados en el tratamiento de las leucemias y ya se han publicado experiencias con CARs en pacientes con glioblastoma multiforme¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. El tercer tipo de inmunoterapia incluye las moléculas que son diseñadas para estimular la actividad global del sistema inmune frente al tumor y se llaman moléculas de los puntos de control inmunes. La mayoría de los tumores activan estos “checkpoint” protectores para frenar al sistema inmune y que no reconozca al tumor como extraño. Afortunadamente se ha descubierto la posibilidad de inactivar dos importantes “checkpoints” para tratar distintos tipos de cáncer, el CTLA-4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4) y el PD-1 (programmed death 1). Estos fármacos que inhiben CTLA-4 y PD-1 ya han sido probados en tumores de adultos como el

melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer renal con buenos resultados y actualmente se están probando en otros tipos de tumores como los cerebrales. Sin embargo, al ser los gliomas de bajo grado relativamente estables, teniendo una tasa muy baja de mutaciones y teniendo múltiples opciones terapéuticas, tanto de distintos agentes quimioterápicos como de la radioterapia, la inmunoterapia en este grupo de tumores no está experimentando un desarrollo similar a otros tumores cerebrales como los gliomas de alto grado o los tumores embrionarios¹⁵⁰. A pesar de esto, el lento crecimiento que caracteriza a los gliomas de bajo grado, los hacen especialmente vulnerables a la inmunoterapia y algunos estudios ya han demostrado respuestas inmunes significativas frente a gliomas de bajo grado, como por ejemplo, un aumento significativo de linfocitos T CD8+ (NCT02358187). El desarrollo de la inmunoterapia en otros tumores y el conocimiento cada vez mayor de esta estrategia terapéutica, hace que en los próximos años veamos con total seguridad un importante avance de esta disciplina en el tratamiento de los gliomas de bajo grado tanto en los adultos como en la edad pediátrica.

Tal como se están desarrollando los acontecimientos en el campo del tratamiento molecular específico, si los resultados en cuanto a eficacia y seguridad de los ensayos clínicos que se están desarrollando en este momento se confirman, debemos esperar que en los próximos años el tratamiento dirigido se deberá considerar en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado de nuevo diagnóstico que precisen tratamiento adyuvante debido a progresión radiológica o a síntomas visuales o neurológicos significativos. Estos pacientes deberán ser tratados exclusivamente en el contexto de ensayos clínicos autorizados.

JUSTIFICACIÓN

2.- JUSTIFICACIÓN

Los gliomas de bajo grado son los tumores del SNC más frecuentes en la edad pediátrica. La resección quirúrgica completa es casi siempre suficiente para conseguir una supervivencia prolongada. Sin embargo, muchos pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado irresecables precisan de tratamientos adyuvantes para el control del tumor a largo plazo. Actualmente, la mayoría de los pacientes reciben quimioterapia como tratamiento de elección inicial con el objetivo de evitar o retrasar los efectos secundarios del tratamiento con radioterapia. Sin embargo, también las quimioterapias utilizadas pueden presentar efectos secundarios a corto y largo plazo. Es por ello que es necesario evaluar nuevas quimioterapias (como la vinblastina) en el tratamiento de primera línea de los gliomas de bajo grado en la edad pediátrica.

Históricamente, algunos gliomas de bajo grado irresecables no son biopsiados y se inicia tratamiento convencional tras un diagnóstico radiológico. Los conocimientos sobre la biología de los gliomas de bajo grado pediátricos han avanzado de forma significativa en los últimos años confirmándose que estos tumores presentan una tasa muy baja de alteraciones moleculares y muchas veces una única alteración en la vía de señalización MAPK. Como en el melanoma y otros tumores en los adultos, se ha observado la presencia de la mutación BRAF V600E en algunos gliomas de bajo grado en la edad pediátrica. Dada la existencia actualmente de fármacos dirigidos específicos sobre esta mutación que podrían ser útiles en el tratamiento de estos pacientes, se hace necesario evaluar la presencia

de esta mutación a nivel general en los pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado y la correlación clínica y pronóstica de esta alteración.

OBJETIVOS

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVOS PRINCIPALES

1.- Evaluar la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progresión de la vinblastina semanal en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado en progresión o irresecables de nuevo diagnóstico que no hayan recibido previamente quimioterapia o radioterapia.

2.- Determinar la incidencia real, la localización y los subtipos histológicos más frecuentes de los gliomas de bajo grado pediátricos que presentan la mutación BRAF V600E. Analizar el efecto de esta alteración molecular en la supervivencia global y en la supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes.

3.2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

1.- Analizar la supervivencia libre de progresión de la vinblastina semanal en pacientes pediátricos con neurofibromatosis tipo 1 con gliomas de bajo grado en progresión o irresecables de nuevo diagnóstico que no hayan recibido previamente quimioterapia o radioterapia.

2.- Evaluar la calidad de vida durante el tratamiento con vinblastina semanal de los pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado en progresión o irresecables de nuevo diagnóstico que no hayan recibido previamente quimioterapia o radioterapia.

3.- Analizar el efecto de la vinblastina semanal sobre la visión en aquellos pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado de las vías ópticas en progresión o irresecables de nuevo diagnóstico que no hayan recibido previamente quimioterapia o radioterapia.

4.- Estudiar la respuesta a la quimioterapia convencional y la supervivencia libre de progresión tras los tratamientos convencionales (quimioterapia y radioterapia) en los gliomas de bajo grado de la edad pediátrica con la mutación BRAF V600E.

5.- Determinar el efecto de la delección de CDKN2A en los gliomas de bajo grado de la edad pediátrica.

6.- Explorar la utilidad de los inhibidores de BRAF V600E en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado refractarios al tratamiento convencional.

RESULTADOS

ARTÍCULO 1

4.1.- ARTÍCULO 1

Título:

Phase II weekly vinblastine for chemotherapy naïve children with progressive low-grade glioma. A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium study.

Autores:

Alvaro Lassaletta, Katrin Scheinemann, Shayna M Zelcer, Juliette Hukin, Beverly A Wilson, Nada Jabado, Anne Sophie Carret, Lucie Lafay-Cousin, Valerie Larouche, Cynthia E Hawkins, Gregory Russell Pond, Ken Poskitt, Daniel Keene, Donna L Johnston, David D Eisenstat, Rahul Krishnatry, Matthew Mistry, Anthony Arnoldo, Vijay Ramaswamy, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, and Eric Bouffet.

Revista:

Journal Clinical Oncology 2016 Aug 29. pii: JC0681585 [Epub ahead of print]

RESUMEN

OBJETIVO

El tratamiento con vinblastina en monoterapia ha demostrado efectividad y un perfil bajo de toxicidad en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. El objetivo de este estudio fue de analizar la actividad de la vinblastina como tratamiento de primera línea.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes menores de 18 años con gliomas de bajo grado irresecables y/o en progresión fueron elegibles para el estudio. La vinblastina se administró de forma intravenosa a una dosis de 6 mg/m² semanal durante un periodo de 60 semanas. Las variables analizadas y relacionadas con el pronóstico fueron la visión, la calidad de vida, presencia de neurofibromatosis tipo 1 y la presencia de mutación BRAF V600E y fusión BRAF.

RESULTADOS

Se incluyeron 54 pacientes con una mediana de edad de 8 años (rango, 0,7 a 17,2 años). La localización en la mayoría de los pacientes fue en la zona quiasmática/hipotalámica (55,5%), y 13 pacientes presentaban neurofibromatosis tipo 1 (24,1%). La histología más frecuente fue el astrocitoma pilocítico (46,3%). Diecisiete pacientes fueron diagnosticados exclusivamente por técnicas de imagen. La mejor respuesta a la quimioterapia se reviso de manera centralizada, con una tasa de respuesta (respuesta completa + parcial + menor) del 25,9%. La

estabilización de la enfermedad (completa + parcial + menor + enfermedad estable) se consiguió en el 87% de los pacientes. Se observó una mejoría de la visión en el 20% de los pacientes con localización del tumor en las vías ópticas. La supervivencia global y la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue del 94,4% (95% IC, 88,5 a 100%) y 53,2% (95% IC, 41,3 a 68,5%) respectivamente para la serie completa. Los pacientes con neurofibromatosis tipo 1 presentaron una enfermedad libre de progresión a los 5 años (85,1%; 95% IC, 68 a 100% significativamente mejor que los pacientes sin neurofibromatosis tipo 1 (42,0%; 95% IC, 29,1 al 60,7%). Las edades menores de 3 años o mayores de 10 años no se asociaron a un mal pronóstico. El tratamiento fue muy bien tolerado y la calidad de vida de los pacientes no se vió afectada durante el tratamiento. En este estudio no hubo correlación entre las alteraciones de BRAF y el pronóstico.

CONCLUSIÓN

La vinblastina administrada una vez a la semana se tolera muy bien en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. La supervivencia global y libre de progresión son comparables a otros regímenes de quimioterapia utilizados actualmente, con un mejor perfil de toxicidad y una buena calidad de vida mantenida.

Phase II Weekly Vinblastine for Chemotherapy-Naïve Children With Progressive Low-Grade Glioma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium Study

Alvaro Lassaletta, Katrin Scheinemann, Shayna M. Zelcer, Juliette Hukin, Beverley A. Wilson, Nada Jabado, Anne Sophie Carret, Lucie Lafay-Cousin, Valerie Larouche, Cynthia E. Hawkins, Gregory Russell Pond, Ken Poskitt, Daniel Keene, Donna L. Johnston, David D. Eisenstat, Rahul Krishnatry, Matthew Mistry, Anthony Arnoldo, Vijay Ramaswamy, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, and Eric Bouffet

Author affiliations appear at the end of this article.

Published online ahead of print at www.jco.org on August 29, 2016.

Supported by a grant from the Ontario Institute Cancer Research. A.L. was supported by the Meagan Bebenek Fellowship in Pediatric Neuro-Oncology and funds (Restrcomp) from the Garron Family Chair in Childhood Cancer Research at The Hospital for Sick Children. R.K. received a fellowship sponsored by the Society of Neuro-Oncology as an international research development grant.

Presented in part at the 49th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, May 31-June 4, 2013; 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, September 25-28, 2013; 51st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, May 29-June 2, 2015; and 47th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Cape Town, South Africa, October 8-11, 2015.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest are found in the article online at www.jco.org. Author contributions are found at the end of this article.

Clinical trial information: NCT00575796.

Corresponding author: Eric Bouffet, MD, The Hospital for Sick Children, 555 University Ave, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1X8; e-mail: eric.bouffet@sickkids.ca.

© 2016 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/16/3499-1/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2016.68.1585

ABSTRACT

Purpose

Vinblastine monotherapy has shown promising activity and a low-toxicity profile in patients with pediatric low-grade glioma (PLGG) who experienced treatment failure after initial treatment with chemotherapy and/or radiation. The aim of this study was to assess the activity of vinblastine in therapy-naïve children.

Patients and Methods

Patients < 18 years old with unresectable and/or progressive therapy-naïve PLGG were eligible. Vinblastine was administered once per week at a dose of 6 mg/m² intravenously over a period of 70 weeks. Vision, quality of life, neurofibromatosis type 1 (NF1) status, and *BRAF* mutation/fusion status were also determined and correlated with outcome.

Results

Fifty-four patients were enrolled onto the study, with a median age of 8 years (range, 0.7 to 17.2 years). Most patients had chiasmatic/hypothalamic tumors (55.5%), and 13 patients (24.1%) had NF1. The most common histology was pilocytic astrocytoma (46.3%). Seventeen patients were diagnosed using radiologic criteria alone. Best response to chemotherapy was centrally reviewed with a response rate (complete, partial, or minor response) of 25.9%. Disease stabilization (complete, partial, or minor response or stable disease) was achieved in 47 patients (87.0%). Visual improvement was observed in 20% of patients with optic pathway glioma. Five-year overall survival and progression-free survival (PFS) rates were 94.4% (95% CI, 88.5% to 100%) and 53.2% (95% CI, 41.3% to 68.5%), respectively, for the entire cohort. Patients with NF1 had a significantly better PFS (85.1%; 95% CI, 68.0% to 100%) when compared with patients without NF1 (42.0%; 95% CI, 29.1% to 60.7%; *P* = .012). Age < 3 years or > 10 years was not associated with poor outcome. Treatment was well tolerated, and quality of life was not affected during treatment. In this trial, there was no correlation between *BRAF* alterations and outcome.

Conclusion

Vinblastine administered once per week is well tolerated in children with treatment naïve PLGG. Overall survival and PFS are comparable to current therapies, with a favorable toxicity profile and a maintained quality of life.

J Clin Oncol 34. © 2016 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

The role of chemotherapy in the management of pediatric low-grade gliomas (PLGG) has dramatically changed over the past two decades. Initially considered as a salvage option when surgery or radiotherapy had failed,¹⁻³ chemotherapy is now regarded as the first-line treatment of young

children with unresectable PLGG who are deemed not eligible for radiation.⁴ Currently, most patients receive chemotherapy as first-line treatment in the setting of unresectable PLGG with radiologic and/or symptomatic progression.⁵

Chemotherapeutic regimens for PLGG described over the past few decades have comparable efficacy, but their toxicity profiles differ. Common adverse effects include neurotoxicity

(vincristine), hypersensitivity (carboplatin), hearing loss (cisplatin), infertility, and other long-term toxicities with alkylating agents (procarbazine and lomustine) or increased risk of secondary malignancies with etoposide.⁶ The ideal chemotherapy regimen should have a similar progression-free survival (PFS) as earlier regimens, with little if any short- and long-term toxicity, and be able to be administered over a long period of time without cumulative toxicity.

Single-agent vinblastine has shown promising activity and a low-toxicity profile in patients with PLGG who experienced treatment failure after initial treatment with chemotherapy and/or radiation.⁷⁻⁹ The objective of this study was to explore the efficacy and toxicity profile of vinblastine used as a first-line agent in chemotherapy- and radiation-naïve children with progressive PLGG. Quality of life (QoL) was assessed during treatment, and the *BRAF* status of the tumors was studied and correlated with outcome.

PATIENTS AND METHODS

Study Protocol

This single-arm, phase II study of vinblastine administered once per week in chemotherapy- and radiation-naïve children with progressive PLGG enrolled patients across 12 institutions of the Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium. Patients < 18 years of age with progressive PLGG after surgical excision or incompletely resected PLGG with a risk of neurologic impairment were eligible. Patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) and optic pathway gliomas (OPGs) were eligible when they had evidence of clinical and/or radiologic progression on consecutive assessments. The primary objective was to examine the efficacy of vinblastine in chemotherapy-naïve children and adolescents with progressive or incompletely resected PLGG. The primary outcome was response rate, which was defined using three-dimensional response criteria (Data Supplement). Secondary end points were PFS at 1, 2, and 5 years; QoL during treatment; and correlation of biologic features with tumor behavior. The study was approved by the institutional review board of each participating institution, and all parents or guardians gave written informed consent. All WHO PLGG morphologic variants were eligible. In addition, children with NF1 and OPG or with large hypothalamic tumors for which a diagnostic biopsy was not considered necessary were eligible without pathologic confirmation. Patients with disseminated PLGG were also eligible. When tumor tissue was available, pathology was centrally reviewed by the study neuropathologist (C.E.H.).

The treatment protocol has been previously described.⁷ Radiologic evaluation was primarily based on T2 fluid-attenuated inversion recovery changes. Further details and evaluation of response are described in the Data Supplement.

Biologic Studies

The *BRAF* V600E somatic point mutation and the *BRAF*-K11A1549 fusion were evaluated for all evaluable tumors. *BRAF* mutational analysis was conducted using digital droplet polymerase chain reaction (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) or immunohistochemistry if the amount of tissue was insufficient. *BRAF* fusion was analyzed by NanoString technology (NanoString Technologies, Seattle, WA) or fluorescent in situ hybridization (FISH) if only slides were available. Further information is available in the Data Supplement.

QoL

The 24-item PedsQL Brain Tumor Module (Mapi Research Trust, Lyon, France) has been validated for children age 2 to 18 years¹⁰ and encompasses the following six scales: cognitive problems (seven items), pain and hurt (three items), movement and balance (three items),

procedural anxiety (three items), nausea (five items), and worry (three items). Items are reverse scored and linearly transformed to a 0 to 100 scale. Higher scores indicate better health-related QoL. For patients > 2 years of age who consented to this aspect of the study, caregivers or patients completed the questionnaires during regular clinic visits at diagnosis, week 26, and week 70.

Statistical Analyses

Descriptive statistics were used to summarize patient, disease, and treatment characteristics, along with outcomes. The Kaplan-Meier method was used to determine distribution of survival. The log-rank test was used to explore for differences in PFS between characteristics of interest, whereas Fisher's exact test was used for response. For statistical purposes, response was dichotomized into response (complete, minor, or partial) versus non-response (all others). All tests were two-sided, and statistical significance was defined as $P \leq .05$.

RESULTS

Patient Characteristics

Study accrual spanned November 2007 to August 2010. The last follow-up analysis was conducted in January 2015. Initially, 55 patients were enrolled onto the study; however, one patient was deemed ineligible because central pathology review revealed a diagnosis of a high-grade glioma. Thus, all results are representative of 54 eligible patients. Median age at study enrollment was 8 years (range, 0.7 to 17.2 years). Table 1 lists the demographic and clinical characteristics of the study patients. The majority of patients harbored hypothalamic/chiasmatic tumors (55.5%). Thirty-seven

Table 1. Patient Demographic and Clinical Characteristics

Characteristic	No. of Patients (%)
Sex	
Male	31 (57)
Female	23 (43)
Neurofibromatosis type 1	13 (24.1)
Age at diagnosis, years	
Mean (SD)	7.5 (4.8)
Median	7.1
Range	0.6-16.14
Age at beginning of vinblastine, years	
Mean (SD)	8.5 (5.2)
Median	8.0
Range	0.7-17.2
Age at beginning of vinblastine, years	
< 2	5 (9.3)
2-10	26 (48.1)
> 10	23 (42.6)
Tumor site	
Hypothalamic/chiasmatic	30 (55.5)
Brainstem	11 (20.3)
Disseminated	4 (7.5)
Other site*	9 (16.7)
Pathology	
Pilocytic astrocytoma	25 (46.3)
Low-grade glioma NOS	8 (14.8)
Pilomyxoid astrocytoma	4 (7.4)
No histology	17 (31.5)

Abbreviations: NOS, not otherwise specified; SD, standard deviation.

*Other sites include cerebellum (n = 3), hemispheric (n = 2), thalamus (n = 2), and spine (n = 2).

patients had a histologic diagnosis, and pathology was centrally reviewed in 35 patients (95%). The most common histology was pilocytic astrocytoma ($n = 25$).

Response to Treatment

Central radiology review was conducted on 52 patients, with 94% of the assessments performed in three diameters. Best response to treatment showed one complete response (CR), nine partial responses (PR), four minor responses (MR), 34 patients with stable disease (SD), and six patients with progressive disease (PD), for a total response rate (CR+PR+MR) of 25.9% (14 of 54 patients). Two patients not centrally reviewed had SD in their institutional assessment. Disease stabilization (CR+PR+MR+SD) was achieved in 47 patients (87.0%). Median time to best response was 52 weeks for responding patients (25.5 weeks for patients with NF1 ν 52 weeks for patients without NF1; $P = .21$). Six patients had PD at week 12. Although progression had to be confirmed on two consecutive magnetic resonance imaging scans, four patients discontinued vinblastine at week 12 or earlier—one patient because of rapid progression after 3 weeks of vinblastine treatment, and three patients as a result of the local investigator's decision. The other two patients continued vinblastine treatment and achieved a delayed response; one achieved CR at week 26, and the other achieved MR at week 52. In total, seven patients experienced progression during treatment, and 18 patients experienced progression after completion of vinblastine. All four patients with dissemination experienced progression.

At a median follow-up of 5 years, 31 patients have not required any further therapy. Two of those patients had radiologic progression after completion of vinblastine but did not require further treatment. Three patients (5.5%) died of disease progression at 8, 34, and 34 months, respectively (all patients without NF1; one patient had disease located in the brainstem, one in the spine, and one had disseminated disease). Five-year overall survival (OS) was 94.4% (95% CI, 88.5% to 100%), and 5-year PFS was 53.2% (95% CI, 41.3% to 68.5%; [Figs 1A and 1B](#)). If only patients who needed further treatment after progression are considered, the 5-year PFS was $60.3\% \pm 6.8\%$. Six patients received radiation at a median of 26 months (range, 2 to 62 months) since starting vinblastine, with an overall 5-year radiation-free survival of 87.0% (95% CI, 78.5% to 96.5%; [Fig 1C](#)). PFS stratified by sex, age, location of tumor, and histology were not significant ([Appendix Figs A1 and A2](#), online only).

Vision

Of the 25 patients with OPG, five patients (20%) had improved visual acuity. In four patients visual acuity remained stable, but visual fields improved. In nine patients, vision remained stable. Four patients had visual deterioration during treatment (two patients had PD and discontinued vinblastine at weeks 9 and 39, respectively, and two patients finished vinblastine therapy and remained stable). Finally, in two patients, vision was normal throughout treatment with vinblastine. Information was missing in one patient.

Patients Older Than 10 Years

Twenty-three patients (42.6%) were > 10 years of age at enrollment. Patient characteristics were as follows: seven patients

were girls, four patients had NF1, and nine patients had OPG. Best response to chemotherapy included five PRs, one MR, 15 patients with SD, and two patients who were not evaluable (one because of death before assessment and another because the patient came off study), for a response rate of 26.1%, with no significant difference compared with younger patients. Two patients experienced progression during vinblastine treatment. Five-year PFS for older patients was similar to that in the younger group (54.8% [95% CI, 33.6% to 76.0%] ν 51.6% [95% CI, 34% to 69.2%], respectively; $P = .63$; [Appendix Fig A1A](#)). Four patients received radiation. Five-year radiation-free survival was also similar in both groups ($81.8\% \pm 8.2\% \nu 91.9\% \pm 5.6\%$ for older and younger patients, respectively; $P = .11$). Two patients > 10 years of age died of progression.

NF1 and BRAF Status

Thirteen patients (24.1%) had an underlying diagnosis of NF1. These patients were younger at diagnosis than patients who did not have NF1 (median age, 3.84 ν 7.1 years, respectively). Tumor location in all patients with NF1 was the optic pathway. Treatment was well tolerated, although five patients (38%) needed dose reductions. The most common toxicity was hematologic, and eight patients experienced grade ≥ 3 neutropenia. However, two episodes of febrile neutropenia occurred; no patient required transfusions. Best response to chemotherapy included two PRs, two MRs, and nine patients with SD, for a response rate of 30.8%. Median time to best response for responding patients was 25.5 weeks. At a median follow-up of 5.37 years, two patients with NF1 had disease progression. Five-year PFS was 85.1% (95% CI, 68.0% to 100%) compared with 42.0% (95% CI, 29.1% to 60.7%) for patients without NF1 ($P = .012$; [Fig 1D](#)). None of the patients with NF1 received radiation. No patient died of progression.

Of 37 patients who underwent surgery at diagnosis, one did not consent for biology studies; there was insufficient tissue after central review in five patients. Thirty-one samples were analyzed for *BRAF* V600E mutation. Three tumors (thalamic, spinal, and hypothalamic) had *BRAF* V600E mutation (9.7%). The patient with the hypothalamic tumor experienced progression during vinblastine treatment and was taken off study on week 35. The other two patients (one SD and one PR) did not show progression on follow-up.

Samples were also tested for *BRAF* fusion; 12 samples were tested by NanoString, 17 by FISH, and two by both methods. In two samples, FISH failed. Thirteen (45%) of 29 samples were positive for *BRAF* fusion. Five-year PFS and OS rates were 56.2% (95% CI, 31.9% to 80.6%) and 100% for *BRAF*-fused patients and did not differ when compared with nonfused patients (44.9% [95% CI, 17.2% to 72.6%] and 87.5% [95% CI, 71.3% to 100%], respectively; $P = .947$; [Appendix Fig 1D](#)).

Toxicity

Overall, treatment was well tolerated. No patient discontinued therapy as a result of toxicity. The main toxicity was hematologic; only 13 patients (24.1%) tolerated the planned dose of vinblastine (6 mg/m^2) during the entire study. In 16 patients (29.6%), the dose was reduced to 5 mg/m^2 , and in 17 patients (31.5%), it was reduced to 4 mg/m^2 . Eight patients (14.8%) discontinued vinblastine before week 70 (seven patients discontinued as a result of disease progression, and for one patient, parents withdrew consent after

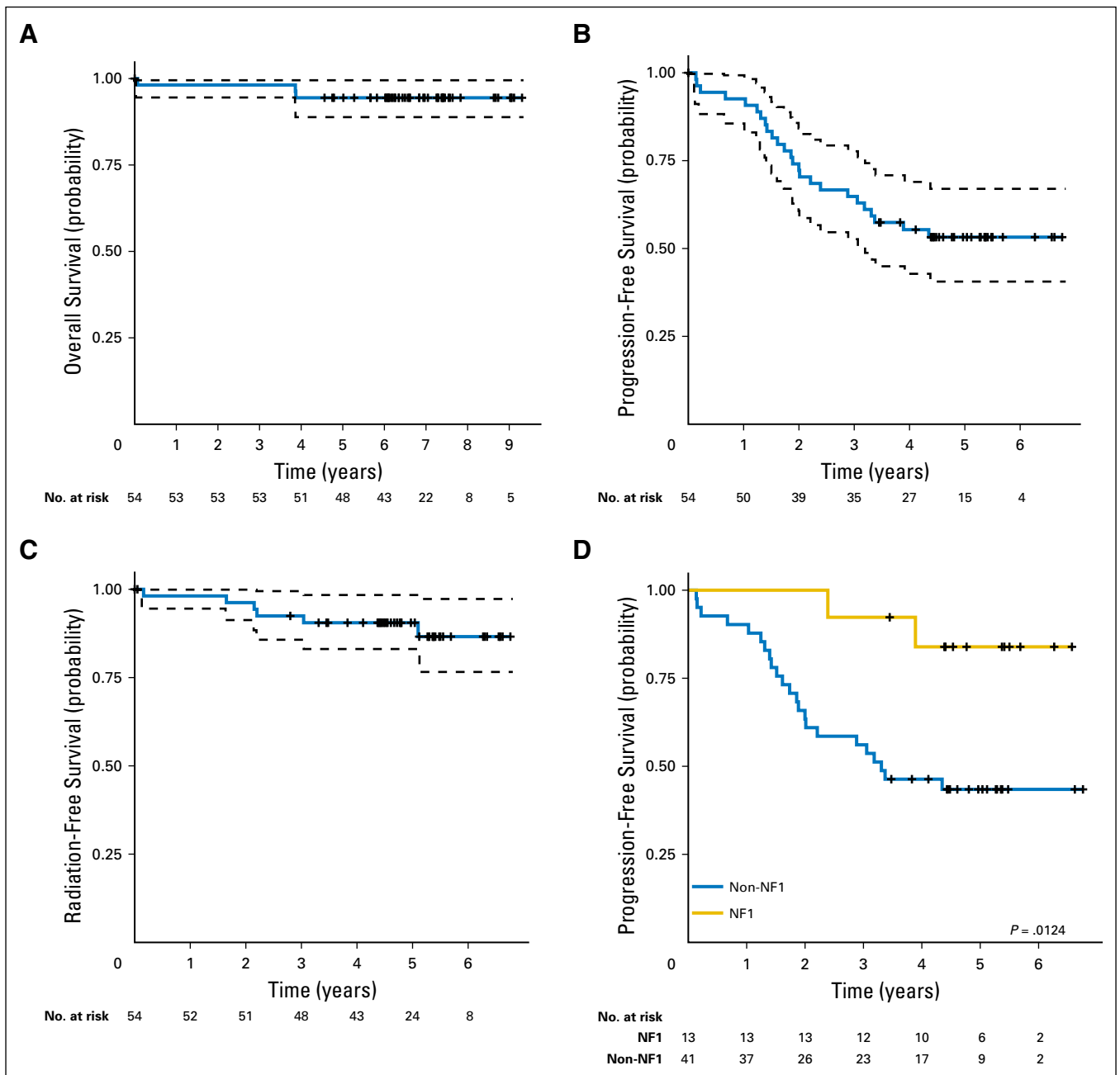


Fig 1. (A) Overall survival, (B) progression-free survival, and (C) radiation-free survival in 54 patients treated with vinblastine. (D) Progression-free survival in patients with and without neurofibromatosis type 1 (NF1; $P = .012$).

40 weeks). There were no differences in OS and PFS according to the dose of vinblastine received.

Forty-eight children (87%) experienced at least one grade ≥ 1 adverse event. The most frequently reported adverse events were neutropenia (41 patients; 75.9%), upper respiratory tract infection (29 patients; 52%), and fever (24 patients; 43%). The most common grade 3 and 4 AEs probably related to the study drug included grade 3 and 4 neutropenia in 22 patients (40.7%) and 19 patients (35.2%), respectively; seven episodes of grade 3 febrile neutropenia in six patients (11.1%); grade 3 documented infection in five patients (zoster, varicella, *Staphylococcus aureus*, influenza H1N1, and pneumonia); and grade 3 anemia in two patients. Only

three patients (5.5%) needed RBC transfusion. No patient required platelet transfusion. No patient had grade ≥ 2 alopecia. Grade 3 and 4 toxicities related to vinblastine are listed in Table 2. There was no report of grade 3 or 4 vinblastine-related constipation or motor or sensory neuropathy. There were no differences in toxicity according to age (\leq or $>$ 10 years of age).

QoL

Of the 49 patients eligible for the QoL study, 35 (71%) completed the QoL questionnaires. There was no identifiable difference between patients who completed the questionnaires and

Table 2. Cumulative Incidence of Toxicity

Toxicity	Grade 3		Grade 4		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Decreased absolute neutrophil count	22	40.7	19	35.2	41	75.9
Fever and neutropenia	6	11.1	—	—	6	11.1
Infection	5	9.3	—	—	5	9.3
Hemoglobin decrease	2	3.7	—	—	2	3.7
Hypernatremia	—	—	2	3.7	2	3.7
Hypokalemia	2	3.7	—	—	2	3.7
Increased LFTs	1	1.9	1	1.9	2	3.7
Nausea	1	1.9	—	—	1	1.9
Vomiting	1	1.9	—	—	1	1.9
Headache	1	1.9	—	—	1	1.9
Fever	1	1.9	—	—	1	1.9
Tinnitus	1	1.9	—	—	1	1.9

Abbreviation: LFTs, liver function tests.

those who did not (Data Supplement). Overall, patients showed high mean scores on the PedsQL Brain Tumor Module in all areas. A reduction in the nausea score was observed at 70 weeks compared with baseline; however, this was not statistically significant. There were no other statistically significant differences between baseline, week 26, and end of treatment questionnaire results, supporting our hypothesis that patients' QoL would not be affected during vinblastine therapy (Table 3).

DISCUSSION

In this phase II study, vinblastine monotherapy demonstrated comparable clinical activity and PFS to previous chemotherapy studies in PLGG.^{11,12} Several studies have supported the activity of vinblastine in PLGG. A pilot study enrolled 11 patients who had experienced progression after previous chemotherapy and demonstrated tumor shrinkage in six patients, with minor toxicity.¹³ In 2005, we reported the experience of nine patients with carboplatin allergy who were switched to vinblastine once per week. All patients completed treatment, and the overall response rate was remarkable (seven of nine patients responded, and there was no progression).⁸ These studies were followed by a multicenter phase II trial, which accrued 51 patients. In this experience, patients were eligible if they experienced treatment failure with one or several treatments, including radiation. Vinblastine was administered once

per week at a dose of 6 mg/m². Some patients, particularly heavily pretreated patients, required dose adjustment because of hematologic toxicity. The response rate was 33%, and 75% of enrolled patients completed the planned year of chemotherapy. The toxicity was mild, and in particular, no patient required blood or platelet transfusion.⁷ After this experience, vinblastine was considered as a possible first-line option for chemotherapy-naïve patients.

Observation of progression followed by response has been previously described in the chemotherapeutic management of PLGG.^{7,14} In the current study, although progression had to be confirmed on two consecutive magnetic resonance imaging scans, four of six patients with progression at week 12 discontinued treatment at the decision of local investigators. The two other patients, who continued vinblastine treatment, achieved a delayed response. Median time to best response in responding patients was 52 weeks. This suggests that prolonged exposure to vinblastine may be required before activity occurs, and excellent responses can be observed despite transient initial progression.

The toxicity of vinblastine was minimal, allowing 70 weeks of administration without significant toxicity. However, only 24% of patients maintained their initial dose of vinblastine. Nearly two thirds of the patients required dose reduction, mostly as a result of neutropenia. Outcome was similar independent of the dose received. To avoid treatment gaps and optimize the metronomic antiangiogenic effect, we recommend that future vinblastine trials use a dose of 5 mg/m² once per week.

The response rate (CR+PR+MR) observed with vinblastine administered once per week, using stringent response criteria (based on T2 fluid-attenuated inversion recovery changes), seems slightly lower than response rates reported in previous studies using combination chemotherapy (Data Supplement). However, the disease stabilization rate (CR+PR+MR+SD) with vinblastine was 87%, and no correlation between response and long-term tumor control was noted. Knowing that children with PLGG may require several lines of chemotherapy and that similar outcomes have been observed between first-line, second-line, and even successive chemotherapy regimens,¹⁵ the use of vinblastine as first-line chemotherapy seems justified as a result of its low toxicity profile. In those terms, the PFS of vinblastine is comparable to that of other regimens used as first-line chemotherapy in PLGG (Data Supplement).

Results of visual outcome are rarely documented in PLGG trials. In this study, only four of the evaluable patients with OPG experienced visual deterioration. These results compare favorably with the published literature.¹⁶

Table 3. Pediatric Brain QoL Mean Scores Over Time for the Whole Cohort

Measure	Baseline Score (mean ± SD)	Score at 26 Weeks (mean ± SD)	Score at 70 Weeks (mean ± SD)	Mean Difference in Score From Baseline to Week 26 (95% CI)	Mean Difference in Score From Baseline to Week 70 (95% CI)
Cognitive	66.11 ± 26.35	65.54 ± 19.49	67.21 ± 29.41	5.12 (−7.85, 18.10)	−6.18 (−17.89 to 5.53)
Pain	71.67 ± 24.65	67.03 ± 21.88	67.32 ± 16.17	1.04 (−11.29 to 13.37)	−1.96 (−16.67 to 12.84)
Movement/balance	78.67 ± 23.10	68.84 ± 25.89	72.22 ± 26.30	7.29 (−5.25 to 19.84)	5.39 (−5.73 to 16.52)
Anxiety	58.3 ± 38.49	56.88 ± 32.33	57.14 ± 34.16	−4.68 (−26.5 to 17.13)	−5.15 (−21.84 to 11.54)
Nausea	84.2 ± 27.90	76.09 ± 22.81	57.14 ± 34.16	8.75 (−3.54 to 21.04)	10.29 (−4.09 to 24.68)
Worry	76.83 ± 24.38	74.09 ± 29.41	74.01 ± 28.01	2.08 (−7.46 to 11.91)	1.25 (−8.78 to 11.43)

NOTE. Values range from 0 to 100. Higher score indicates better-related QoL. Abbreviations: QoL, quality of life; SD, standard deviation.

In several chemotherapy studies, patients with NF1 seem to do better than patients without NF1 (Data Supplement). To date, first-line chemotherapy in most children with NF1 is the vincristine plus carboplatin combination. We previously showed that in the recurrent setting, 5-year event-free survival was higher for patients with NF1 treated with vinblastine than for patients without NF1.⁷ In the current study, patients with NF1 still show significantly better PFS compared with the population without NF1. Although not significant, for responding patients, the time to best response in the NF1 population seems to be shorter.

In many institutions, the recommended treatment of older children with unresectable PLGG is still focal radiation, despite a risk of significant long-term toxicity. Early studies of chemotherapy were limited to young children, with various age cutoffs between cooperative groups. The largest study reported to date in PLGG was a prospective randomized clinical trial comparing vincristine plus carboplatin versus thioguanine, procarbazine, lomustine, and vincristine in children < 10 years of age.¹¹ The recently closed International Society of Pediatric Oncology Low Grade Glioma protocol (SIOP-LGG-2004³) recommended focal radiation for patients > 8 years of age. However, recent reports suggest teenagers can achieve sustained tumor control with chemotherapy.¹⁷⁻¹⁹ In addition, information from biologic studies suggests older children may have PLGG associated with less aggressive behavior.^{20,21} In our study, 43% of patients were > 10 years of age. Response rate, OS, PFS, and radiation-free survival were similar in older and younger patients. There were no significant differences in terms of toxicity. This trial suggests that all children and adolescents with unresectable PLGG can be treated with chemotherapy to avoid or postpone the use of radiotherapy.

To our knowledge, this is the first prospective clinical trial in PLGG with biology correlatives. The most frequent genetic alterations identified in PLGGs to date involve *BRAF*.²² Many PLGGs harbor a *BRAF*-KIAA1549 fusion,²³ whereas the incidence of *BRAF* V600E mutation is less common.²⁴⁻²⁶ With the limitations of a small sample size, we did not observe any prognostic implications of *BRAF* status. Because a proportion of patients are still not biopsied (31% in our study), the role of *BRAF* alterations needs to be further studied in larger clinical trials.

To our knowledge, this study is the first prospective PLGG trial to evaluate QoL during treatment. Although the compliance rate in this experience was limited, with only 71% of patients participating, we were able to show that QoL was not negatively affected; this is important for a protocol extending beyond 1 year. We acknowledge the limitations of this QoL study and, in particular,

the difficulties of evaluating QoL in children < 2 years of age as a result of the lack of validated tools. However, this information is important for future comparisons between treatment regimens. Knowing that most chemotherapy regimens used in PLGG achieve similar responses, QoL evaluation seems crucial when choosing between these therapies.

This is one of the largest studies of single-agent first-line chemotherapy in PLGG. Our results show that vinblastine is an excellent therapeutic option. All patients, including those affected by NF1, benefit from a less toxic treatment with similar efficacy, in terms of OS, PFS, and visual outcomes, as other regimens used as first-line treatment. Vinblastine is easy to administer and inexpensive, has minimal short-term and long-term toxicity, and demonstrates a relatively maintained QoL. Hence, implementation of vinblastine chemotherapy as first-line treatment holds promise for all children and especially for those in middle- or low-income countries where financial restraints and treatment-related toxicities are major challenges.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at www.jco.org.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Beverly A. Wilson, Nada Jabado, Lucie Lafay-Cousin, Valerie Larouche, Cynthia E. Hawkins, Daniel Keene, Donna L. Johnston, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, Eric Bouffet
Provision of study materials or patients: Alvaro Lassaletta, Katrin Scheinemann, Shayna M. Zelcer, Juliette Hukin, Nada Jabado, Anne Sophie Carret, Lucie Lafay-Cousin, Valerie Larouche, Cynthia E. Hawkins, Donna L. Johnston, David D. Eisenstat, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, Eric Bouffet

Collection and assembly of data: Alvaro Lassaletta, Katrin Scheinemann, Shayna M. Zelcer, Juliette Hukin, Anne Sophie Carret, Daniel Keene, Donna L. Johnston, David D. Eisenstat, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Eric Bouffet

Data analysis and interpretation: Alvaro Lassaletta, Anne Sophie Carret, Gregory Russell Pond, Ken Poskitt, Daniel Keene, Rahul Krishnatry, Matthew Mistry, Anthony Arnoldo, Vijay Ramaswamy, Uri Tabori, Eric Bouffet

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

REFERENCES

- Rosenstock JG, Evans AE, Schut L: Response to vincristine of recurrent brain tumors in children. *J Neurosurg* 45:135-140, 1976
- Lefkowitz IB, Packer RJ, Sutton LN, et al: Results of the treatment of children with recurrent gliomas with lomustine and vincristine. *Cancer* 61: 896-902, 1988
- Gnekow AK, Kandels D, Walker DA, et al: A randomized trial of intensification of induction-chemotherapy within an 18 months treatment-strategy on tumor-response at 24 weeks and progression-free-survival in pediatric low grade glioma (LGG): Preliminary results of the SIOP-LGG-2004 Working Group. *Neuro-oncol* 16:i60-i70, 2014 (suppl 1)
- Packer RJ, Lange B, Ater J, et al: Carboplatin and vincristine for recurrent and newly diagnosed low-grade gliomas of childhood. *J Clin Oncol* 11: 850-856, 1993
- Bergthold G, Bandopadhyay P, Bi WL, et al: Pediatric low-grade gliomas: How modern biology reshapes the clinical field. *Biochim Biophys Acta* 1845:294-307, 2014
- Nageswara Rao AA, Packer RJ: Advances in the management of low-grade gliomas. *Curr Oncol Rep* 16:398, 2014
- Bouffet E, Jakacki R, Goldman S, et al: Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol* 30:1358-1363, 2012
- Lafay-Cousin L, Holm S, Qaddoumi I, et al: Weekly vinblastine in pediatric low-grade glioma patients with carboplatin allergic reaction. *Cancer* 103:2636-2642, 2005
- Singh G, Wei XC, Hader W, et al: Sustained response to weekly vinblastine in 2 children with

pilocytic astrocytoma associated with diencephalic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 35:e53-e56, 2013

10. Palmer SN, Meeske KA, Katz ER, et al: The PedsQL Brain Tumor Module: Initial reliability and validity. *Pediatr Blood Cancer* 49:287-293, 2007

11. Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al: Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 30:2641-2647, 2012

12. Gnekow AK, Falkenstein F, von Hornstein S, et al: Long-term follow-up of the multicenter, multidisciplinary treatment study HIT-LGG-1996 for low-grade glioma in children and adolescents of the German Speaking Society of Pediatric Oncology and Hematology. *Neuro-oncol* 14:1265-1284, 2012

13. Bouffet E, Hargrave D, Cairney E, et al: Weekly vinblastine for recurrent/progressive low grade gliomas. *Neuro-oncol* 4:215, 2002 (abstr 6)

14. Massimino M, Spreafico F, Cefalo G, et al: High response rate to cisplatin/etoposide regimen in childhood low-grade glioma. *J Clin Oncol* 20:4209-4216, 2002

15. Scheinemann K, Bartels U, Tsangaris E, et al: Feasibility and efficacy of repeated chemotherapy for

progressive pediatric low-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer* 57:84-88, 2011

16. Moreno L, Bautista F, Ashley S, et al: Does chemotherapy affect the visual outcome in children with optic pathway glioma? A systematic review of the evidence. *Eur J Cancer* 46:2253-2259, 2010

17. Heath JA, Turner CD, Poussaint TY, et al: Chemotherapy for progressive low-grade gliomas in children older than ten years: The Dana-Farber experience. *Pediatr Hematol Oncol* 20:497-504, 2003

18. Dodgshun AJ, Maixner WJ, Heath JA, et al: Single agent carboplatin for pediatric low-grade glioma: A retrospective analysis shows equivalent efficacy to multiagent chemotherapy. *Int J Cancer* 138:481-488, 2016

19. Chong AL, Pole JD, Scheinemann K, et al: Optic pathway gliomas in adolescence: Time to challenge treatment choices? *Neuro-oncol* 15:391-400, 2013

20. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al: BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 17:4790-4798, 2011

21. Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, et al: The role of telomere maintenance in the spontaneous growth arrest of pediatric low-grade gliomas. *Neoplasia* 8:136-142, 2006

22. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al: Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 45:602-612, 2013

23. Kilday JP, Bartels UK, Bouffet E: Targeted therapy in pediatric low-grade glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14:441, 2014

24. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y, et al: Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol* 119:641-649, 2010

25. Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, et al: Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. *Neuro-oncol* 14:777-789, 2012

26. Ho CY, Mobley BC, Gordish-Dressman H, et al: A clinicopathologic study of diencephalic pediatric low-grade gliomas with BRAF V600 mutation. *Acta Neuropathol* 130:575-585, 2015

Affiliations

Alvaro Lassaletta, Cynthia E. Hawkins, Rahul Krishnatry, Matthew Mistry, Anthony Arnoldo, Vijay Ramaswamy, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, and Eric Bouffet, The Hospital for Sick Children, Toronto; Katrin Scheinemann, McMaster Children's Hospital; Shayna M. Zelcer, Children's Hospital of Western Ontario, London; Gregory Russell Pond, Ontario Clinical Oncology Group, McMaster University, Hamilton; Daniel Keene and Donna L. Johnston, Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, Ontario; Juliette Hukin and Ken Poskitt, British Columbia Children's Hospital, Vancouver, British Columbia; Beverley A. Wilson, University of Alberta Hospital; Lucie Lafay-Cousin, Alberta Children's Hospital, Calgary; David D. Eisenstat, Stollery Children's Hospital, Edmonton; Alberta; Nada Jabado, McGill University; Anne Sophie Carret, Hospital Sainte Justine, Montreal; Valerie Larouche, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, Québec; and David D. Eisenstat, Cancer Care Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Phase II Weekly Vinblastine for Chemotherapy-Naïve Children With Progressive Low-Grade Glioma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium Study

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or jco.ascopubs.org/site/ifc.

Alvaro Lassaletta**Travel, Accommodations, Expenses:** Takeda**Katrin Scheinemann**

No relationship to disclose

Shayna M. Zelcer

No relationship to disclose

Juliette Hukin

No relationship to disclose

Beverly A. Wilson

No relationship to disclose

Nada Jabado

No relationship to disclose

Anne Sophie Carret

No relationship to disclose

Lucie Lafay-Cousin

No relationship to disclose

Valerie Larouche

No relationship to disclose

Cynthia E. Hawkins**Honoraria:** Merck**Patents, Royalties, Other Intellectual Property:** The Hospital for Sick Children**Gregory Russell Pond****Consulting or Advisory Role:** Profound Medical**Ken Poskitt**

No relationship to disclose

Daniel Keene

No relationship to disclose

Donna L. Johnston

No relationship to disclose

David D. Eisenstat**Honoraria:** Roche Canada**Travel, Accommodations, Expenses:** Roche Canada**Rahul Krishnatry**

No relationship to disclose

Matthew Mistry

No relationship to disclose

Anthony Arnoldo

No relationship to disclose

Vijay Ramaswamy

No relationship to disclose

Annie Huang

No relationship to disclose

Ute Bartels

No relationship to disclose

Uri Tabori

No relationship to disclose

Eric Bouffet**Research Funding:** Genentech

Acknowledgment

We thank Ella Barlev and Janice Jordaan for their work as clinical research associates of the study.

Appendix

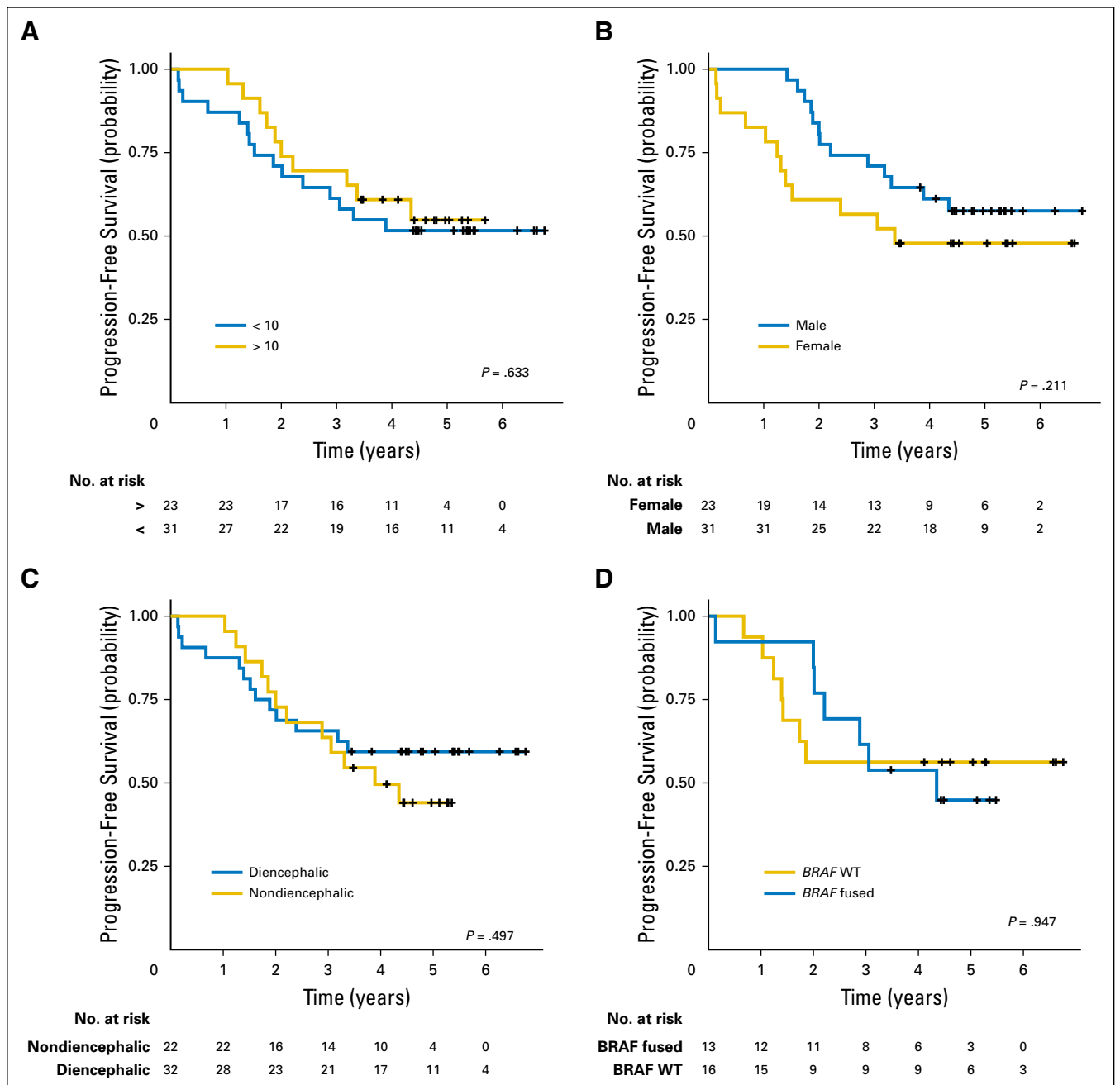


Fig A1. Progression-free survival stratified by (A) age (< and > 10 years); (B) sex; (C) tumor location; and (D) *BRAF* fusion status (fused v nonfused). WT, wild type.

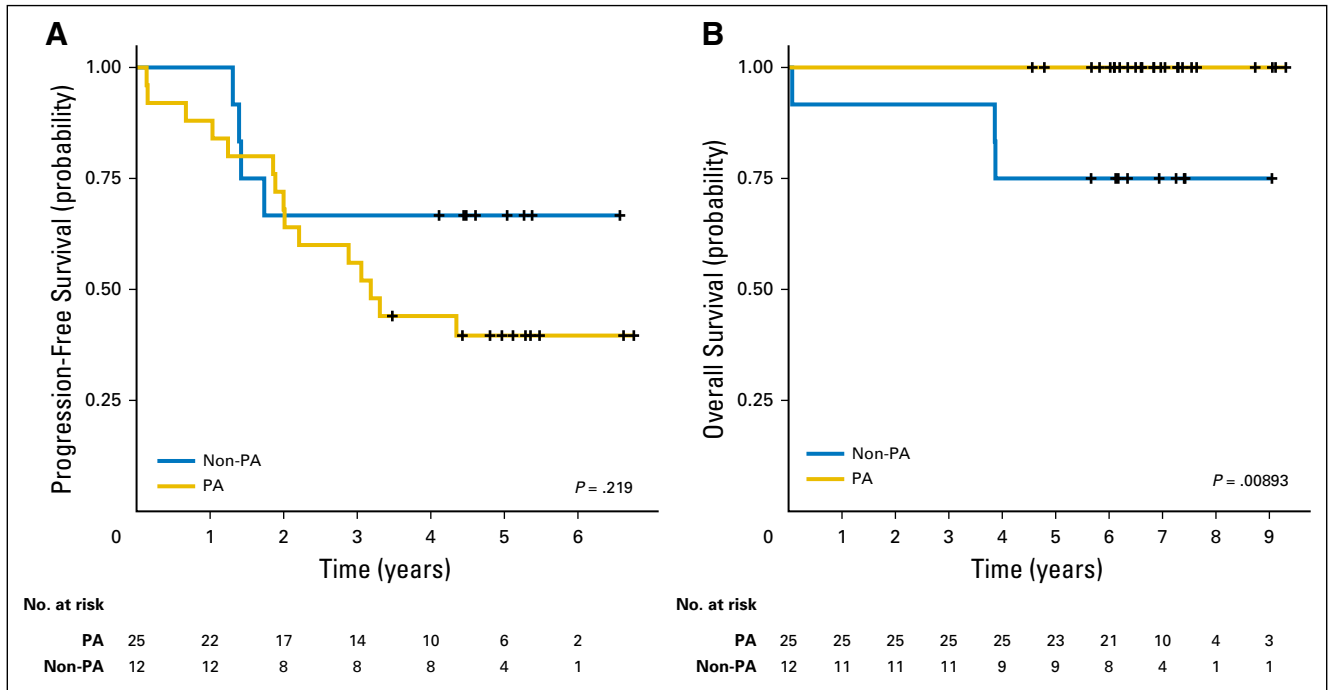


Fig A2. (A) Progression-free survival and (B) overall survival stratified by pathology. PA, pilocytic astrocytoma.

SUPPLEMENTAL DATA

METHODS

Biological Studies

FISH and immunohistochemistry

Detection of the BRAF fusion by FISH was performed as previously reported²⁰. Detection of BRAFV600E by immunohistochemistry was done on our Benchmark Ventana Machine using the Optiview detection kit. CC1 was used for heat retrieval for 40 minutes. Thirty-six minutes incubation with the Ms Anti BRAFV600E monoclonal antibody from Spring Bioscience. Casein was used for 8 minutes to help lessen some background staining and hematoxylin counterstain for 12 minutes.

Digital Droplet PCR-Rare Event Detection

For the present work, we used digital droplet PCR (BioRad Laboratories) to detect the somatic point mutation c.1799 C>T in the BRAF gene (p.V600E). DNA was first isolated from paraffin-embedded tumor tissue (FFPE) using the MasterPure[™] Complete DNA & RNA Purification Kit (Epicentre; MC85200) according to manufacturer's instructions. The rare event detection assay for BRAF V600E was conducted according to manufacturers' instructions. In brief, each 20- μ l reaction mixture contained 50ng DNA, 12.5 μ l ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad Laboratories), 1.25 μ l PrimePCR[™] ddPCR Mutation Assay BRAF WT for p.V600E, Human (Unique Assay ID: dHsaCP2000028),

1.25ul PrimePCR™ ddPCR Mutation Assay BRAF p.V600E, Human (Unique Assay ID: dHsaCP2000027), and 1ul Fast Digest BsuRI (#FD0154, Thermo Scientific). The PCR reaction mixtures were partitioned into an emulsion of approximately 20,000 uniformly sized droplets. The droplets were then transferred to a 96-well PCR plate, heat sealed, and placed in a conventional thermal cycler (BioRad C1000 Touch™ Thermal Cycler). Thermal cycling conditions were 95°C for 10 min, 39 cycles of 94°C for 30s and 55°C for 60s, 98°C for 10min, and a 4°C hold. After the PCR, the PCR plate was loaded on a QX100 droplet reader (Bio-Rad QX100 System). Analysis of the ddPCR data was performed with Quanta-Soft software (version 1.6.6; Bio-Rad). Each tumor sample was run in technical duplicates.

Nanostring

Total RNA was extracted from FFPE tissue using the RNeasy FFPE extraction kit (Qiagen). RNA quantity and quality were assessed by Nanodrop 200 and QuBit 3.0 (RNA BR Assay, Life technologies). A probe set targeting the 33 most commonly reported fusions in pediatric glioma (**Supplemental Table 5**) was designed in collaboration with NanoString (WA, USA). Five hundred nanograms of total RNA was added to the nCounter Elements TagSet in hybridization buffer and incubated at 67°C for 20 hours. The sample was then processed on the nCounter Preparation Station and the cartridge was scanned at 555 fields of view on the nCounter Digital Analyzer. The raw counts were subjected to a technical normalization and fusion transcripts were considered detected if the count was above the average of overall fusion counts plus 3 standard deviations.

Treatment protocol

Therapy was to be initiated within 21 days of being registered on the study. Vinblastine was given as an intravenous push at a dose of 6 mg/m^2 (10 mg maximum) once a week (± 2 days) for a total duration of 70 weeks. In patients with a body surface area (BSA) $< 0.6 \text{ m}^2$, doses were calculated according to weight $[(\text{dose/m}^2) \times 1/30 \times \text{body weight (kg)}]$. Dose modifications were made for hematologic toxicity. If the ANC was less than 750 but $\geq 500/\mu\text{L}$ and/or the platelet count was $< 75,000/\mu\text{L}$ but $\geq 50,000/\mu\text{L}$ then the dose was reduced to 5 mg/m^2 or to 20% of the originally prescribed dose for a BSA $< 0.6 \text{ m}^2$. If the ANC was $< 500/\mu\text{L}$ and/or the platelet count was $< 50,000/\mu\text{L}$, vinblastine was withheld until blood count recovery to ANC = $750/\mu\text{L}$ and platelet count = $75,000/\mu\text{L}$. Vinblastine was then resumed at 5 mg/m^2 or at 80% of the originally prescribed dose for BSA $< 0.6 \text{ m}^2$.

For patients who still demonstrated hematological toxicity at a reduced dose of 5 mg/m^2 the recommendation was to decrease the dose to 4 mg/m^2 or to by 33 % of the originally prescribed dose for BSA $< 0.6 \text{ m}^2$. Once the dose was reduced, there was no drug dose escalation, even when blood counts were satisfactory. Growth factors were not permitted. Toxicities were graded according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events²⁷.

Vision assessment

For children with optic pathway tumors, complete ophthalmologic examination (visual acuity and visual field assessment if age / patient co-operation permitted) were performed as per individual institutional standards of

care) was prospectively performed within 2 weeks of entrance to study, and at weeks 12, 26, 39, 52, and 70 (+/- 2 weeks).

Evaluation of response

A baseline MRI was required in all patients within 4 weeks prior to the initiation of chemotherapy. Imaging was repeated at completion of the 12-week induction period. Subsequent imaging studies were performed at weeks 26, 39, 52, and 70 from time of entry into the study. Patients who showed progression on 2 consecutive imaging studies (>25% or 40% increase in tumor size according to 2D or 3D measurements, respectively) or evidence of clinical progression were removed from study. For children with optic/chiasmatic gliomas, unequivocal progressive visual function deterioration even in the face of an unchanged tumor volume, as determined by MRI was considered as tumor progression. Vision was assessed at baseline and at weeks 12, 26, 39, 52, and 70. For patients who completed the 70 weeks of vinblastine, follow-up scans were performed at 3 months interval for one year, at 6 months interval the second year, and then yearly off therapy for 5 years. All MRIs included T1, T2 and FLAIR sequences, and T1+ contrast images. Response criteria for this study were determined by changes in size using the maximal three-dimensional (3D) cross-sectional tumor measurements. When only two measurements were available, response was assessed by using the product of the largest two tumor diameters (two-dimensional [2D]). Response criteria are listed in **Supplemental Table 1**.

Since the relevance of contrast enhancement for response's evaluation in PLGG is not well defined, changes in contrast were not taken into

consideration. Moreover, it has been previously described^{7,14,28} that a moderate increment of the tumor dimension can be observed during the first weeks of therapy and more specially between week 1 and 12; it was therefore strongly recommended to await the response evaluation performed at week 26 before deciding on the final response to the initial part of therapy and consequently on the decision to continue treatment. Patients who showed stabilization after initial progression were considered as having PD for response purposes, but they were allowed to stay on study. Complete, partial, minor responses, and stable disease were considered positive responses in this protocol. Treatment failure was defined as the date of new clinical symptoms or radiologic progression that required a change in management or initiation of a new treatment.

Supplemental Table 1. Definition of response for the 2D and 3D measurement methods.

Response	2D Method	3D Method
Complete response	Complete disappearance of tumor on imaging studies	Complete disappearance of tumor on imaging studies
Partial response	Reduction of at least 50% in the sum of the product of the 2 largest perpendicular diameters of all target lesions	Reduction of at least 65% in the sum of the product of the 3 largest perpendicular diameters of all target lesions
Minor response	Reduction of at least 25% in the sum of the product of the 2 largest perpendicular diameters of all target lesions	Reduction of at least 40% in the sum of the product of the 3 largest perpendicular diameters of all target lesions
Stable disease	No change or a decrease/increase of $\leq 25\%$ (sum of the product of the 2 largest perpendicular diameters of all target lesions)	No change or a decrease/increase of $\leq 40\%$ (sum of the product of the 3 largest perpendicular diameters of all target lesions)
Progressive disease	$>25\%$ increase (sum of the product of the 2 largest perpendicular diameters of all target lesions)	$>40\%$ increase (sum of the product of the 3 largest perpendicular diameters of all target lesions)

Abbreviations: 2D, two dimensional; 3D, three dimensional

Supplemental table 2. Study Population Demographic Characteristics for QoL studies.

		Number (%) of persons eligible to participate in QoL	Number of persons who completed QoL questionnaires	Number persons who did not complete QoL questionnaires
Total number		54	35	19
Gender	Male	31(57.4%)	19	12
	Female	23(42.6%)	16	7
NF1	Yes	13(24.1%)	9	4
	No	41 (75%)	26	15
Location	Hypothalamic	30 (55.6%)	17	13
	Thalamus	2 (3.7%)	2	0
	Cerebral hemisphere	2 (3.7%)	2	0
	Brainstem	11 (20.4%)	8	3
	Cerebellum	3(5.6%)	2	1
	Spinal cord	2(3.7%)	2	0
	Disseminated	4 (7.4%)	2	2
Response	Complete	1 (1.9%)	1	0
	Partial	9(16.7%)	5	4
	Minor	4 (7.4%)	3	1
	Stable	34 (63%)	23	11
	Progression	6(11.1%)	3	3
Age at time of diagnosis	Under 3 years	12	3	9
	Between 3 and 6 years	7	6	1
	Under 6 years	19	9	10
	6 to 12 years	19	14	5
	Over 12 years	16	12	4
Mean age (years)			9.55+ 4.62	6.75 + 5.39

Supplemental Table 3. Previous prospective clinical studies using chemotherapy for children with newly diagnosed low-grade glioma.

Chemotherapy regimen	Study period	n	NF-1%	Median age (Range)	Median Follow-up	Response rate	OS	PFS	EFS	Reference
Single carboplatin		104	32%	5.8 y (3m-16y)	Mean 54 m	86% CR+PR+SD	5y 97%	5y 51%		Dodgshun et al ²⁹
Vincristine + carboplatin + Temozolomide	2004-2007	66	0	4.6 y (0.4-9.8y)		2 CR/15 PR/30 SD/10 PD	5y 87%	5y 46%		Chintagumpala et al ³³
Vincristine + carboplatin	1997-2005	137	0	<10 years		35% CR+PR/15% MR/17% SD/33% PD			5y 39%	Ater et al ¹¹
TPCV	1997-2005	137	0	<10 years		30% CR+PR/22% MR/16% SD/32% PD			5y 52%	Ater et al ¹¹
Cyclophosphamide	1996-1997	15		39 months (2-71m)		1 CR/ 8 SD/ 5 PD Insufficient activity				Kadota et al ³⁰
Vincristine + carboplatin	1989-1993	78	19%	3 years (3m-16y)	30 m	56% Objective response		3y 68%		Packer et al ³¹
Vincristine + carboplatin		9	56%	4.8 years		5PR /4 SD				Demaerel et al ³²
Vincristine + carboplatin	1996-2004	216	25%	3.2 y (range 0.2-16.3y)	10.4 y	3.8%CR/31.6%PR/56% MR-SD/ 8.1% PD	10y 94%	10y 62%	10y 47%	Gnekow et al ¹²
Carbo+etoposide/CPM+V/ lomustine+PC+V		7	0		4.3 y	2 CR/3 MR/2 SD				Bruggers et al ³³
Carboplatin + etoposide		13			30 m	1 CR/3 MR/6 SD/3 PD				Castello et al ³⁴
Carboplatin + vinblastine	2006-2008	18	33%	4.4 y (0.7-14.8y)		1 PR/5 MR/8 SD/ 2 PD				Jackaki et al ³⁵ 2011
Cisplatin + etoposide	1991-2000	31	24%	45 months	44 m	1 CR/11 PR/12 MR/10 SD	3y 100%	3y 78%		Massimino et al ¹⁴
Cisplatin + etoposide (lower doses)	2001-2007	37	19%	6 years	48 m	1CR/18PR/6MR/12SD	5y 86%	5y 60%		Massimino et al ³⁶
Vincristine and etoposide		6		1,5 years (6 m - 13 years)		4 SD/2 PD				Pons et al ³⁷
TPDCV:	1984-1992	33	18%	3 years (0.3–16.2y)	15.2 y		5y	5y		Mishra et al ³⁸

6TG+procarbazine+dibromodulcitol+CCNU+vincristine							91%	30%		
Procarbazine+carboplatin / etoposide + cisplatin / vincristine + CPM	1990-1998	85	27%	17 months (1 day - 123 months)	6.5 y	CR+PR = 42%	5y 89%	5y 34%		Laithier et al ²⁸
Temozolomide	1999-2005	11		11 years (9-17 years)		2 PR/1 MR/7 SD/1 PD				Broniscer et al ³⁹
Single carboplatin	1993-2000	58	27%	49 months (1-186 months)	55 m	CR+PR+MR=28%. CR+PR+MR+SD=85%				Gururangan et al ⁴⁰

Abbreviations: TPCV (Thioguanine+procarbazine+CCNU+vincristine); CPM (cyclophosphamide); PC (procarbazine); V (vincristine); NF (neurofibromatosis); CR (complete response); PR (partial response); MR (minimal response); SD (stable disease); PD (progressive disease); OS (overall survival); PFS (progression free survival); EFS (event free survival).

Supplemental Table 4. Previous clinical studies using chemotherapy in children with Neurofibromatosis type I.

STUDY	n	CHEMO	LINE CT	LOC.	PFS	OS	AGE median	TOXICITY	BEST RESPONSE
Packer et al ³¹	15	Vincristine + carboplatin	First	OPG	79±11 (2y)				
Massimino et al ¹⁴	8	Cisplatin + VP16	First	OPG	100% (3 y)	100% (3y)		Ototoxicity	
Gururangan et al ⁴⁰	22	Carboplatin	Recurrence	20 OPG	72% (3 y)			Hematological	
Laithier et al ²⁸	23	PC + Carboplatin Cisplatin + VP16 Vincristine + CPM	First and recurrence	OPG	82% (3y)		3 y		
Broniscer et al ³⁹	4	Temozolomide	Recurrence	OPG					PR 1; SD 3
Massimino et al ³⁶	7	Lower doses cisplatin+ VP16			85% (3y)	100% (3y)		Ototoxicity (less)	PD 1
Gnekow et al ¹²	55	Vincristine + carboplatin	First		73% (5y) 57% (10y)		5.1y	53% carbo allergy 50% hem grade III-IV	PR 2; SD 48; PD 4; DOD 1
Bouffet et al ⁷	9	Vinblastine	Recurrence		75±15% (5y)			2 peripheral neuropathy	Response Rate 5/9
Fisher et al ⁴¹	105	91 V+C weekly 14 V+C monthly							PR 21; MR 10; SD 57; PD 8
Gururangan et al ⁴²	5	Avastin + Irinotecan	Recurrence		No info				
Ater et al ⁴³	129	Vincristine + carboplatin	First		68.7±4.8% (5y)	98.4% (5y)			61% (CR + PR + MR)
Cappellano et al ⁴⁴	3	Vinorelbine	First	OPG					1 CR, 1MR, 1SD

Abbreviations: VP16 (etoposide); PC (procarbazine); CPM (cyclophosphamide); V (vincristine); C (carboplatin); OPG (optic pathway glioma); FN (febrile neutropenia); CR (complete response); PR (partial response); MR (minimal response); SD (stable disease); PD (progressive disease); OS (overall survival); PFS (progression free survival).

Supplemental table 5. BRAF fusions targeted in the Nanostring analysis.

<i>KIAA1549-BRAF fusion transcripts</i>	<i>Others fusion transcripts</i>	<i>Transcripts generated by</i>	<i>4 housekeeping transcripts</i>
KIAA1549(exon13)-BRAF(exon9)	BRAF(exon7)-MACF1(exon19)	FGFR1 tandem duplication	ABCF1(NM_001090.2)
KIAA1549(exon15)-BRAF(exon10)	CLCN6(exon2)-BRAF(exon11)	MYBL1 deletion/tandem dup	ALAS1(NM_000688.4)
KIAA1549(exon15)-BRAF(exon11)	ETV6(exon1)-NTRK3(exon18)		CLTC(NM_004859.2)
KIAA1549(exon15)-BRAF(exon9)	FAM131B(exon1)-BRAF(exon10)		HPRT1(NM_000194.1)
KIAA1549(exon16)-BRAF(exon10del74)	FAM131B(exon2)-BRAF(exon9)		
KIAA1549(exon16)-BRAF(exon11)	FAM131B(exon3)-BRAF(exon9)		
KIAA1549(exon16)-BRAF(exon9)	FGFR1(exon17)-TACC1(exon7)		
KIAA1549(exon18)-BRAF(exon10)	FGFR3(exon17)-TACC3(exon4)		
KIAA1549(exon19)-BRAF(exon9)	FXR1(exon13)-BRAF(exon10)		
	GNAI1(exon1)-BRAF(exon10)		
	MKRN1(exon4)-BRAF(exon11)		
	MYB(exon6)-MAML2-(exon4)		
	MYB(exon9)-PCDHGA1(exon2)		
	NACC2(exon4)-NTRK2(exon13)		
	NTRK3(exon10)-ETV6(exon5)		
	QKI(exon1)-RAF1(exon14)		
	QKI(exon2)-MYB(exon16)		
	QKI(exon6)-NTRK2(exon16)		
	RNF130(exon3)-BRAF(exon9)		
	SRGAP3(exon11)-RAF1(exon8)		
	SRGAP3(exon12)-RAF1(exon10)		
	ST6GAL1(exon2)-WHSC1(exon4)		

SUPPLEMENTAL REFERENCES

27. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0. NCI, NIH, DHHS. May 29, 2009

28. Laithier V, Grill J, Le Deley MC, et al: Progression-free survival in children with optic pathway tumors: dependence on age and the quality of the response to chemotherapy--results of the first French prospective study for the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 21:4572-8, 2003

29. Dodgshun AJ, Hansford JR, Cole T, et al: Carboplatin hypersensitivity reactions in pediatric low grade glioma are protocol specific and desensitization shows poor efficacy. *Pediatr Blood Cancer*, 2015

30. Kadota RP, Kun LE, Langston JW, et al: Cyclophosphamide for the treatment of progressive low-grade astrocytoma: a Pediatric Oncology Group phase II Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:198-202, 1999

31. Packer RJ, Ater J, Allen J, et al: Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low-grade gliomas. *J Neurosurg* 86:747-54, 1997

32. Demaerel P, de Ruyter N, Casteels I, et al: Visual pathway glioma in children treated with chemotherapy. *Eur J Paediatr Neurol* 6:207-12, 2002

33. Bruggers CS, Greene D: A phase 2 feasibility study of sequential, dose intensive chemotherapy to treat progressive low-grade gliomas in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 29:602-7, 2007

34. Castello MA, Schiavetti A, Padula A, et al: Does chemotherapy have a role in low-grade astrocytoma management? A report of 13 cases. *Med Pediatr Oncol* 25:102-8, 1995

35. Jakacki RI, Bouffet E, Adamson PC, et al: A phase 1 study of vinblastine in combination with carboplatin for children with low-grade gliomas: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Neuro Oncol* 13:910-5, 2011

36. Massimino M, Spreafico F, Riva D, et al: A lower-dose, lower-toxicity cisplatin-etoposide regimen for childhood progressive low-grade glioma. *J Neurooncol* 100:65-71, 2010

37. Pons MA, Finlay JL, Walker RW, et al: Chemotherapy with vincristine (VCR) and etoposide (VP-16) in children with low-grade astrocytoma. *J Neurooncol* 14:151-8, 1992

38. Mishra KK, Squire S, Lamborn K, et al: Phase II TPDCV protocol for pediatric low-grade hypothalamic/chiasmatic gliomas: 15-year update. *J Neurooncol* 100:121-7, 2010

39. Broniscer A, Gururangan S, MacDonald TJ, et al: Phase I trial of single-dose temozolomide and continuous administration of o6-benzylguanine in children with brain tumors: a pediatric brain tumor consortium report. *Clin Cancer Res* 13:6712-8, 2007

40. Gururangan S, Cavazos CM, Ashley D, et al: Phase II study of carboplatin in children with progressive low-grade gliomas. *J Clin Oncol* 20:2951-8, 2002

41. Fisher MJ, Loguidice M, Gutmann DH, et al: Visual outcomes in children with neurofibromatosis type 1-associated optic pathway glioma following chemotherapy: a multicenter retrospective analysis. *Neuro Oncol* 14:790-7, 2012

42. Gururangan S, Fangusaro J, Poussaint TY, et al: Efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent low-grade gliomas--a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncol* 16:310-7, 2014

43. Ater JL, Xia C, Mazewski CM, et al: Nonrandomized comparison of neurofibromatosis type 1 and non-neurofibromatosis type 1 children who received carboplatin and vincristine for progressive low-grade glioma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*, 2016

44. Cappellano AM, Petrilli AS, da Silva NS, et al: Single agent vinorelbine in pediatric patients with progressive optic pathway glioma. *J Neurooncol* 121:405-12, 2015

ARTÍCULO 2

4.2.- ARTÍCULO 2

Título:

Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF-V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas

Autores:

Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Marion Honnorat, Rahul Krishnatry, Ana Guerreiro Stucklin, Nataliya Zhukova, Anthony Arnoldo, Scott Ryall, Catriona Ling, Tara McKeown, Jim Loukides, Ofelia Cruz, Carmen de Torres, Cheng-Ying Ho, Roger J Packer, Ruth Tatevossian, Ibrahim Qaddoumi, Julie H Harreld, James D Dalton, Jean Mulcahy-Levy, Nicholas Foreman, Matthias A Karajannis, Shiyang Wang, Matija Snuderl, Amulya Nageswara Rao, Caterina Giannini, Mark Kieran, Keith L Ligon, Maria Luisa Garre, Paolo Nozza, Samantha Mascelli, Alessandro Raso, Sabine Mueller, Theodore Nicolaides, Karen Silva, Romain Perbet, Alex Vasiljevic, Cecile Faure Conter, Didier Frappaz, Sarah Leary, Courtney Crane, Aden Chan, Ho-keung Ng, Zhi-feng Shi, Ying Mao, Elizabeth Finch, David Eisenstat, Bev Wilson, Anne Sophie Carret, Peter Hauser, David Sumerauer, Lenka Krskova, Valerie Larouche, Adam Fleming, Shayna Zelcer, Nada Jabado, James T Rutka, Peter Dirks, Michael D Taylor, Shiyi Chen, Ute Bartels, Annie Huang, David W Ellison, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, and Uri Tabori.

Revista:

Journal Clinical Oncology 2017. Aceptado para publicación 31 de Mayo de 2017

RESUMEN

ANTECEDENTES

La mutación BRAF V600E es una diana terapéutica potencial que se detecta en una proporción de gliomas de bajo grado pediátricos. Su impacto desde el punto de vista biológico y clínico en este grupo heterogéneo de tumores continúa siendo desconocido.

MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo tanto clínico como genético con largo seguimiento de 510 pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado del hospital SickKids. Los datos clínicos y de tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E (n=90) fueron comparados con una cohorte internacional independiente de gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E (n=180).

RESULTADOS

La mutación BRAF V600E se detectó en el 17% de los gliomas de bajo grado pediátricos. Estos tumores que presentaban la mutación se identificaron en distintos subtipos histológicos y en distintas localizaciones, incluyendo la línea media, localización que no es biopsiada de forma rutinaria en la práctica clínica diaria. Los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E presentaban mal pronóstico tras la administración de quimioterapia y radioterapia convencionales con supervivencias libres de progresión a 10 años del 27% (95%

IC, 12,1 a 41,9%) cuando se comparaban con aquellos que no presentaban la mutación 60,2% (95% IC, 53,3 a 67,1%)($p<0,01$). El análisis clínico y molecular demostró que la resección quirúrgica no completa y la delección de CDKN2A contribuían independientemente a un peor pronóstico en aquellos pacientes con la mutación BRAF V600E. Similares resultados se confirmaron en la cohorte internacional. En el análisis cuantitativo de las pruebas de imagen se objetivó una mala respuesta a la quimioterapia convencional en la mayoría de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E.

CONCLUSION

Los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E constituyen una entidad diferenciada con mal pronóstico cuando se tratan con tratamientos convencionales.

Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas

Q:1, 2

Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Marion Honnorat, Rahul Krishnatry, Ana Guerreiro Stucklin, Nataliya Zhukova, Anthony Arnoldo, Scott Ryall, Catriona Ling, Tara McKeown, Jim Loukides, Ofelia Cruz, Carmen de Torres, Cheng-Ying Ho, Roger J. Packer, Ruth Tatevossian, Ibrahim Qaddoumi, Julie H. Harreld, James D. Dalton, Jean Mulcahy-Levy, Nicholas Foreman, Matthias A. Karajannis, Shiyang Wang, Matija Snuderl, Amulya Nageswara Rao, Caterina Giannini, Mark Kieran, Keith L. Ligon, Maria Luisa Garre, Paolo Nozza, Samantha Mascelli, Alessandro Raso, Sabine Mueller, Theodore Nicolaides, Karen Silva, Romain Perbet, Alexandre Vasiljevic, Cécile Faure Conter, Didier Frappaz, Sarah Leary, Courtney Crane, Aden Chan, Ho-Keung Ng, Zhi-Feng Shi, Ying Mao, Elizabeth Finch, David Eisenstat, Bev Wilson, Anne Sophie Carret, Peter Hauser, David Sumerauer, Lenka Krskova, Valerie Larouche, Adam Fleming, Shayna Zelcer, Nada Jabado, James T. Rutka, Peter Dirks, Michael D. Taylor, Shiyi Chen, Ute Bartels, Annie Huang, David W. Ellison, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, and Uri Tabori

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Published at jco.org on XXXX, 2017.

C.H. and U.T. contributed equally to this work.

Corresponding author: Uri Tabori, MD, Division of Haematology/Oncology, University of Toronto, Research Institute and The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, The Hospital for Sick Children, 555 University Ave, Toronto, ON, Canada, M5G 1X8; e-mail: uri.tabori@sickkids.ca.

© 2017 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/17/3599-1/\$20.00

ABSTRACT

Purpose

BRAF V600E is a potentially highly targetable mutation detected in a subset of pediatric low-grade gliomas (PLGGs). Its biologic and clinical effect within this diverse group of tumors remains unknown.

Patients and Methods

A combined clinical and genetic institutional study of patients with PLGGs with long-term follow-up was performed (N = 510). Clinical and treatment data of patients with BRAF V600E mutated PLGG (n = 99) were compared with a large international independent cohort of patients with BRAF V600E mutated-PLGG (n = 180).

Results

BRAF V600E mutation was detected in 69 of 405 patients (17%) with PLGG across a broad spectrum of histologies and sites, including midline locations, which are not often routinely biopsied in clinical practice. Patients with BRAF V600E PLGG exhibited poor outcomes after chemotherapy and radiation therapies that resulted in a 10-year progression-free survival of 27% (95% CI, 12.1% to 41.9%) and 60.2% (95% CI, 53.3% to 67.1%) for BRAF V600E and wild-type PLGG, respectively ($P < .001$). Additional multivariable clinical and molecular stratification revealed that the extent of resection and *CDKN2A* deletion contributed independently to poor outcome in BRAF V600E PLGG. A similar independent role for *CDKN2A* and resection on outcome were observed in the independent cohort. Quantitative imaging analysis revealed progressive disease and a lack of response to conventional chemotherapy in most patients with BRAF V600E PLGG.

Conclusion

BRAF V600E PLGG constitutes a distinct entity with poor prognosis when treated with current adjuvant therapy.

J Clin Oncol 35. © 2017 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Pediatric low-grade gliomas (PLGGs) are the most frequent brain tumors in children¹ and comprise a heterogeneous group of tumors with different locations, histologic subtypes, ages at presentation,² and clinical behavior. In recent years, the genetic background of PLGGs³ has begun to be unraveled. Although PLGGs are

genetically quiet and each tumor harbors few genetic alterations, these ultimately converge on the activation of the RAS/MAPK pathway,^{4,5} and these alterations are commonly mutually exclusive driving tumor formation. The scarcity of other genetic alterations in PLGGs is in keeping with the generally benign behavior; however, the role, if any, that these alterations play in predicting response to therapy and clinical outcome is still

ASSOCIATED CONTENT



Appendix
DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.8726>

DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.8726>

not known. As a result, as far as nonsurgical treatment is concerned, all patients with PLGGs receive similar treatment independent of their tumor's molecular alterations.⁶ For deeply located tumors, such as hypothalamic/chiasmatic LGGs, the need for biopsy before treatment decisions are made for these children is still debated.

The BRAF V600E mutation, which is observed in a variety of adult⁷ and pediatric neoplasms, is thought to be present in only a small percentage of PLGGs.⁸ Controversy still exists as to whether BRAF V600E-mutant PLGG constitutes a unique subgroup with respect to natural history and outcome.^{9,10} We have previously reported that PLGGs that transform to high-grade gliomas have a high incidence of BRAF V600E mutations in combination with *CDKN2A* deletion.¹¹ *CDKN2A* is a tumor suppressor gene and a key regulator of the cell cycle. *CDKN2A* alterations act as a secondary hit, which allows for escape from cell cycle regulation and malignant behavior in multiple cancer types.^{12,13} In PLGGs, *CDKN2A* loss has been reported to be associated with escape from oncogene-induced senescence,¹⁴ especially when combined with BRAF mutations.

To better define the clinical significance of BRAF V600E in these tumors, we performed a combined clinical and genetic analysis in an institutional discovery cohort of patients with PLGG who were diagnosed and treated in southern Ontario.¹⁵ We then assembled a large multicenter independent cohort of patients with BRAF V600E-mutated PLGG to study their outcome and response to therapy.

PATIENTS AND METHODS

Patient Cohort

Clinical data were obtained from The Hospital for Sick Children (SickKids) institutional PLGG database, which longitudinally observes all patients in southern Ontario who were diagnosed and treated at SickKids between January 1985 and December 2015, as previously reported.^{11,15}

PLGGs were defined as any glial or mixed glial-neural tumor, with the exception of ependymoma, that would be graded as grade I or II according to the revised 4th edition of the WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Specifically, pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplasia and subependymal giant-cell astrocytomas were excluded.

A discovery cohort of all patients with PLGG was assembled for which tissue and V600E mutation analysis was available (N = 510). To assess outcome and response to therapy, all 510 patients were analyzed. To adequately assess the prevalence of BRAF V600E mutations and the association with location and pathology subtypes, tumors that were diagnosed between 2000 and 2015 (n = 449) were analyzed, as 90% of the patients (n = 405) had available molecular data to test for PLGG mutations (Table 1). For outcome of BRAF V600E PLGG, an independent cohort of patients with BRAF V600E-mutated PLGG was assembled from 18 collaborating international pediatric centers. The study was approved by the SickKids' research ethics board and that of all participating institutions.

The extent of surgical resection, radiation, and chemotherapy data and their association with outcome were assessed in both the SickKids cohort and independent cohort. To assess the response to chemotherapy, imaging findings before and 6 months after the initiation of treatment were compared. Progression was defined as the need for treatment change (ie, surgery, alternate chemotherapy, or radiation) related to tumor progression on imaging and/or clinical worsening, as previously described.¹⁶⁻¹⁸

Table 1. Patient and Tumor Characteristics in the SickKids' Cohort (patients from 2000 to 2015)

Characteristic	All Patients (N = 405)	WT (n = 336; 83%)	V600E Mutant (n = 69; 17%)
Gender, %			
Male/female	50.6/49.4	51.2/48.8	47.8/52.2
Age, years			
Median	8.52	8.08	11.1
Range	0-18.28	0.52-18.28	0-17.46
25th/75th quartile	4.34/12.55	4.05/12.02	6.5/14.32
Location, No. (%)			
Hemispheric	157 (100)	114 (72.6)	43 (27.4)
Diencephalic	74 (100)	61 (82.4)	13 (17.6)
Brainstem	39 (100)	33 (84.6)	6 (15.4)
Cerebellum	112 (100)	108 (96.4)	4 (3.6)
Spine	15 (100)	12 (80)	3 (20)
Disseminated	8 (100)	8 (100)	0 (0)
Pathology, No. (%)			
Pilocytic astrocytoma	167 (100)	162 (97)	5 (3)
Piloxyoid astrocytoma	15 (100)	13 (86.7)	2 (13.3)
Ganglioglioma	51 (100)	26 (51)	25 (49)
PXA	9 (100)	2 (22.2)	7 (77.8)
Diffuse astrocytoma	23 (100)	13 (56.5)	10 (43.5)
LGG NOS	70 (100)	56 (80)	14 (20)
Others	70 (100)	64 (91.4)	6 (8.6)

Abbreviations: LGG NOS, low-grade glioma XXXX; PXA, pleomorphic xanthoastrocytoma, WT, wild type.

Molecular Analysis

For the SickKids cohort, BRAF V600E mutations were determined by Droplet Digital (DD)-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA) and/or by a Clinical Laboratory Improvement Amendments–approved immunohistochemistry test. For the independent cohort, V600E mutations were analyzed using institutional Clinical Laboratory Improvement Amendments–approved tests. KIAA1549-BRAF fusion and/or BRAF duplication were evaluated using NanoString (NanoString, Seattle, WA) and/or fluorescent in situ hybridization as described previously.^{16,19}

CDKN2A was analyzed using DD-PCR, single-nucleotide polymorphism array, or FISH for all available samples. For the independent cohort, if *CDKN2A* was not analyzed locally, we performed the assay using DD-PCR. We defined *CDKN2A* deletion as two copy loss by fluorescent in situ hybridization or the relative value that correlates with two copy loss as analyzed by single-nucleotide polymorphism array or DD-PCR, taking into account normal cell infiltration. Additional information on clinical and molecular parameters is available in the Appendix (online only).

Statistical Analysis

Progression-free survival (PFS) was defined as the interval between initial diagnosis and the time of progression. Overall survival (OS) was calculated as the time from diagnosis to the time of death from any cause as reported by the referring institution.

PFS and OS were analyzed by the Kaplan-Meier method, and *P* values are reported using the log-rank test. Survival data are presented as survival estimates, including 95% CIs. Associations between covariates and risk groups were tested by using Fisher's exact test. Univariable and multivariable Cox proportional hazards regression was used to estimate hazard ratios (HRs), including 95% CIs. All *P* values reported are two sided. All statistical analyses were performed with the R statistical environment (version 3.1.2), using R packages survival (version 2.37-7), Regressions Modeling Strategies (version 4.3-1), Cox Regression with Firth's Penalized Likelihood (version 1.1), and Create Elegant Data Visualisations Using

Grammar of Graphics (version 1.0.0), as well as SAS (SAS/STAT User's Guide, version 9.4; SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

BRAF V600E Is Common in PLGG

Among the 405 patients with PLGG who were treated at SickKids between 2000 and 2015, 69 (17%) harbored the BRAF V600E mutation. This analysis included all tumors and not only patients who required additional postoperative treatment. BRAF V600E tumors were diagnosed in all ages and originated from all CNS locations (Table 1). Of importance, the mutation was common in midline tumors, including optic pathway, brainstem, and spinal cord tumors. Overall, 33% of BRAF V600E PLGGs originated in the midline (diencephalon and brainstem). Similarly, BRAF V600E mutations were observed in most pathologic subtypes. As expected, the highest incidence of the mutation was observed in pleomorphic xanthoastrocytoma (78%) followed by gangliogliomas (49%); however, the mutation was also commonly observed in diffuse astrocytomas (43%) and WHO grade I astrocytomas (20%; Table 1).

BRAF V600E Mutation Confers Poor Outcome With Conventional Therapies

Long-term survival data were analyzed in 510 patients with PLGG from the SickKids cohort (mean follow-up, 7 years; range, 0.01 to 28 years).¹⁵ In contrast to other PLGGs, BRAF V600E-mutant tumors (n = 99) continued to progress without reaching a plateau. Five-year PFS for BRAF V600E-mutant and wild-type (WT) PLGG was 50.1% (95% CI, 38.1% to 62.1%) and 72.8% (95% CI, 67.9% to 77.7%), respectively. Furthermore, 10-year PFS for BRAF V600E-mutant and WT PLGG was 27% (95% CI, 12.1% to 41.9%) and 60.2% (95% CI, 53.3% to 67.1%), respectively (HR, 2.04; 95% CI, 1.45 to 2.88; $P < .001$; Fig 1A). Continuous late progression was associated with late deaths in patients with the BRAF-V600E PLGG. Ten-year OS for BRAF V600E and WT PLGG was 83.9% (95% CI, 72.5% to 95.6%) and 92.1% (95% CI, 88.6% to 95.6%), respectively (HR, 1.57; 95% CI, 0.80 to 3.14; $P = .183$; Fig 1B). Of importance, late deaths related to tumor progression were observed in BRAF V600E PLGG even at 25 years of follow-up. Furthermore, survival analysis revealed that patients with BRAF V600E PLGG fared significantly worse than those with the BRAF KIAA1549 fusion (Figs 1C and 1D).

To further examine the causes of poor survival in children with BRAF V600E-mutant PLGG, the effect of current therapeutic interventions in the SickKids' cohort were tested. Despite gross total resection (GTR), which was achieved in 44.4% of these tumors, many patients with BRAF V600E PLGG continued to experience progression postresection. Five-year PFS for GTR and non-GTR was 67.8% (95% CI, 46.8% to 88.8%) and 38.8% (95% CI, 24.1% to 53.5%), respectively ($P = .01$; Fig 2A). These findings are in keeping with analysis performed in BRAF WT PLGG in which we observed a 5-year PFS of 95.9% (95% CI, 92.5% to 99.6%) for GTR and 53.3% (95% CI, 46% to 61.7%) for non-GTR ($P = 8.18 \times 10^{-13}$). Strikingly, PFS was much worse in patients with BRAF V600E PLGG who achieved GTR compared with patients

with BRAF WT PLGG ($P = .00000084$). Similarly, patients with BRAF V600E PLGG experienced poor outcome postradiation and chemotherapy. Five- and 10-year PFS postradiotherapy was 42.2% (95% CI, 20.6% to 63.8%) and 28.1% (95% CI, 6.7% to 49.5%), respectively (Appendix Fig A1A, online only). Thirty-two percent of patients with BRAF V600E-mutant received chemotherapy. Five-year PFS after first-line chemotherapy was 30.4% (95% CI, 13.3% to 47.5%; Appendix Fig A1B).

Copy number status of *CDKN2A* was available for 403 patients with PLGG from the SickKids' cohort. *CDKN2A* was deleted in 25% of BRAF V600E PLGGs and 17% of WT PLGGs. Although *CDKN2A* deletion resulted in poor survival and PFS for the entire cohort, this effect was restricted to BRAF V600E PLGGs (Appendix Fig A2, online only). PFS in children with BRAF V600E PLGG was 24.0% (95% CI, 1.9% to 46.1%) and 68.7% (95% CI, 52.8% to 70.2%) for the *CDKN2A* deleted and balanced tumors, respectively, at 5 years and 0% and 45.9% (95% CI, 21.6% to 70.2%), respectively, at 10 years ($P = .005$; Fig 2C).

To further examine the poor outcome observed in patients with BRAF V600E PLGG in the SickKids' cohort, an independent cohort of 180 patients with BRAF V600E PLGG was compiled from 18 large, pediatric neuro-oncology centers. Characteristics of the independent cohort compared with SickKids' patient cohort with the V600E mutation are listed in Appendix Table A1. Overall, similar poor PFS and OS were observed in patients with the BRAF V600E mutation (Appendix Fig A3, online only). Of importance, as observed in the discovery cohort, a lack of complete resection was associated with poor outcome in patients with BRAF V600E PLGG ($P = .001$; Fig 2B), and *CDKN2A* deletion also conferred poor outcome in the independent cohort ($P = 0.02$; Fig 2D).

An Integrative Prognostic Model for BRAF V600E PLGG

Combining the extent of resection, BRAF V600E and *CDKN2A* deletion revealed a high-risk group of patients with PLGG. In a multivariable Cox proportional hazards regression model of the discovery cohort, BRAF V600E and the extent of resection contributed independently to outcome. Moreover, when interaction between BRAF V600E and *CDKN2A* status was implemented, the combination of BRAF V600E and *CDKN2A* deletion predicted recurrence with an HR of 3.2 ($P = .03$; Table 2). Similarly, the extent of resection and *CDKN2A* status were independent predictors of poor outcome in the BRAF V600E independent cohort. Five-year PFS for patients with BRAF V600E and *CDKN2A* deletion and non-GTR in the SickKids' cohort and independent cohort was 24% (95% CI, 1.9% to 46.1%) and 15% (95% CI, 0% to 42%) respectively. Using c-statistics analysis, the addition of BRAF V600E slightly improved the prediction model expressed by nonsignificant change in area under the curve from 0.814 to 0.826 ($P = .668$).

BRAF V600E PLGG Responds Favorably to Targeted Therapy

Six patients with BRAF V600E-mutated PLGG who experienced progression after conventional treatment were treated with BRAF inhibitors on a compassionate basis. Because targeted therapies represent a novel and attractive option for progressive BRAF V600E cancers,²⁰ quantitative imaging findings at 6 months

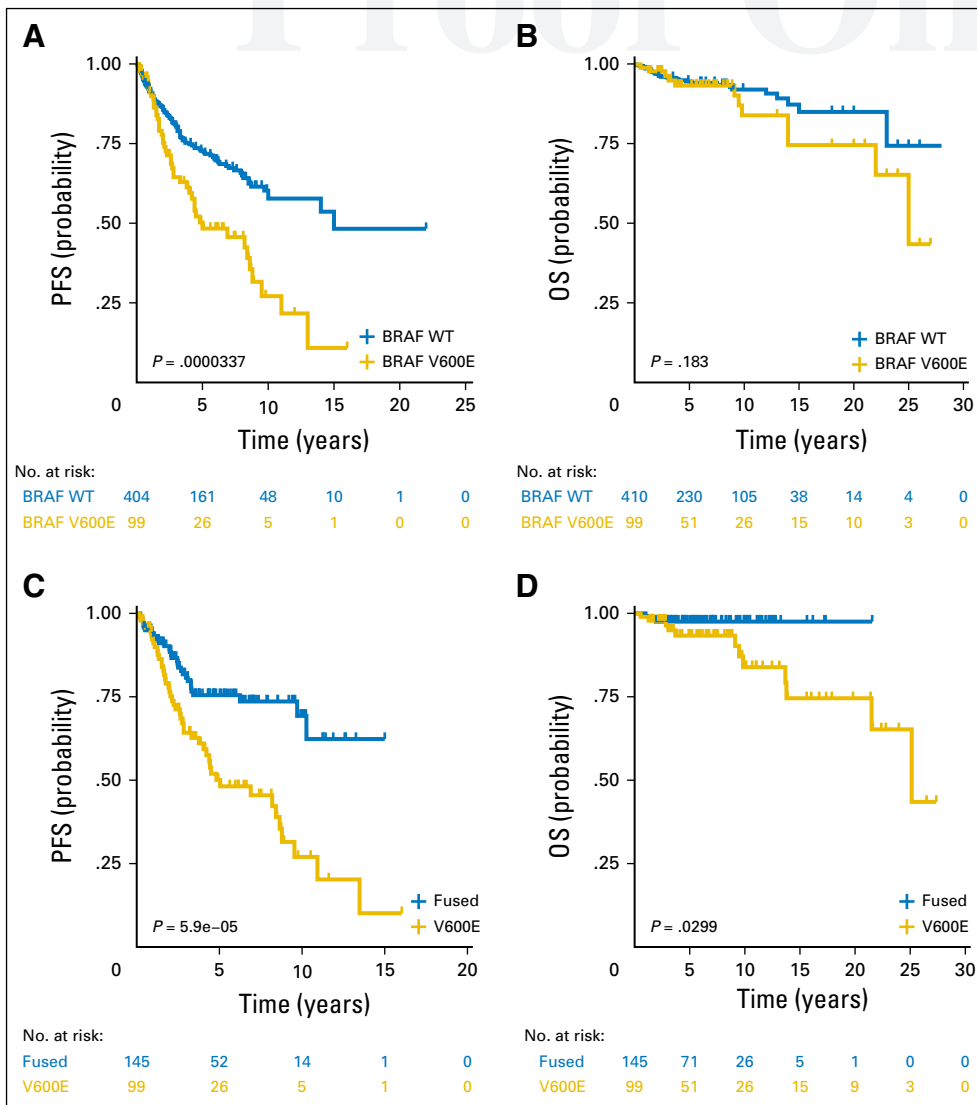


Fig 1. Survival of patients from the SickKids' cohort with pediatric low-grade glioma stratified by BRAF V600E status. (A) Progression-free survival (PFS) of the SickKids' cohort according to BRAF V600E status. (B) Overall survival (OS) for the entire SickKids' cohort according to BRAF V600E status. (C) PFS of the SickKids' cohort comparing BRAF V600E with KIAA1549-BRAF. (D) OS of the SickKids' cohort comparing BRAF V600E with KIAA1549-BRAF. *P* values were determined by using the log-rank test. WT, wild type.

from initiation of conventional chemotherapy and targeted therapy were compared for the SickKids' cohort and independent cohort. At 6 months, only 23% of tumors revealed an objective response to chemotherapy (> 25% of tumor shrinkage). Furthermore, up to 24% of the tumors progressed while on therapy, which resulted in treatment changes. This did not differ between first-line, second-line, and third-line chemotherapy. Of interest, all six progressive tumors, which were treated with V600E inhibitors, showed significant response (49% to 80% cytoreduction) to targeted therapy (Fig 3). All six patients remain on V600E inhibitors to date with a median follow-up of 18.5 months (range, 15 to 36 months). In one patient, the V600E inhibitor was discontinued after 2 years. This patient developed a significant tumor progression associated with clinical deterioration. Therapy was restarted with rapid clinical and radiologic responses.

DISCUSSION

This study explores a specific type of molecularly defined subgroup of PLGG. BRAF V600E is more common than originally thought in PLGG²¹—17% of cases—and is relatively common in previously unrecognized locations, such as the midline. BRAF V600E confers worse outcomes when treated with chemotherapy and radiation compared with BRAF WT PLGG, especially when CDKN2A deletion coexists. It also highlights several important observations that may affect our approach to and management of these tumors.

Although BRAF V600E is known to be common in pleomorphic xanthoastrocytoma and gangliogliomas,²¹⁻²³ this mutation is not restricted to those histologic subtypes and is highly prevalent in diffuse astrocytomas and other low-grade astrocytomas (Table 1). This is in agreement with other smaller series that have reported V600E in all PLGG subtypes.^{24,25} Of importance, BRAF V600E mutation can be found in any location in the CNS, and > 33% of BRAF V600E-mutant tumors are located in the midline (diencephalon and brainstem). Tumors in these locations

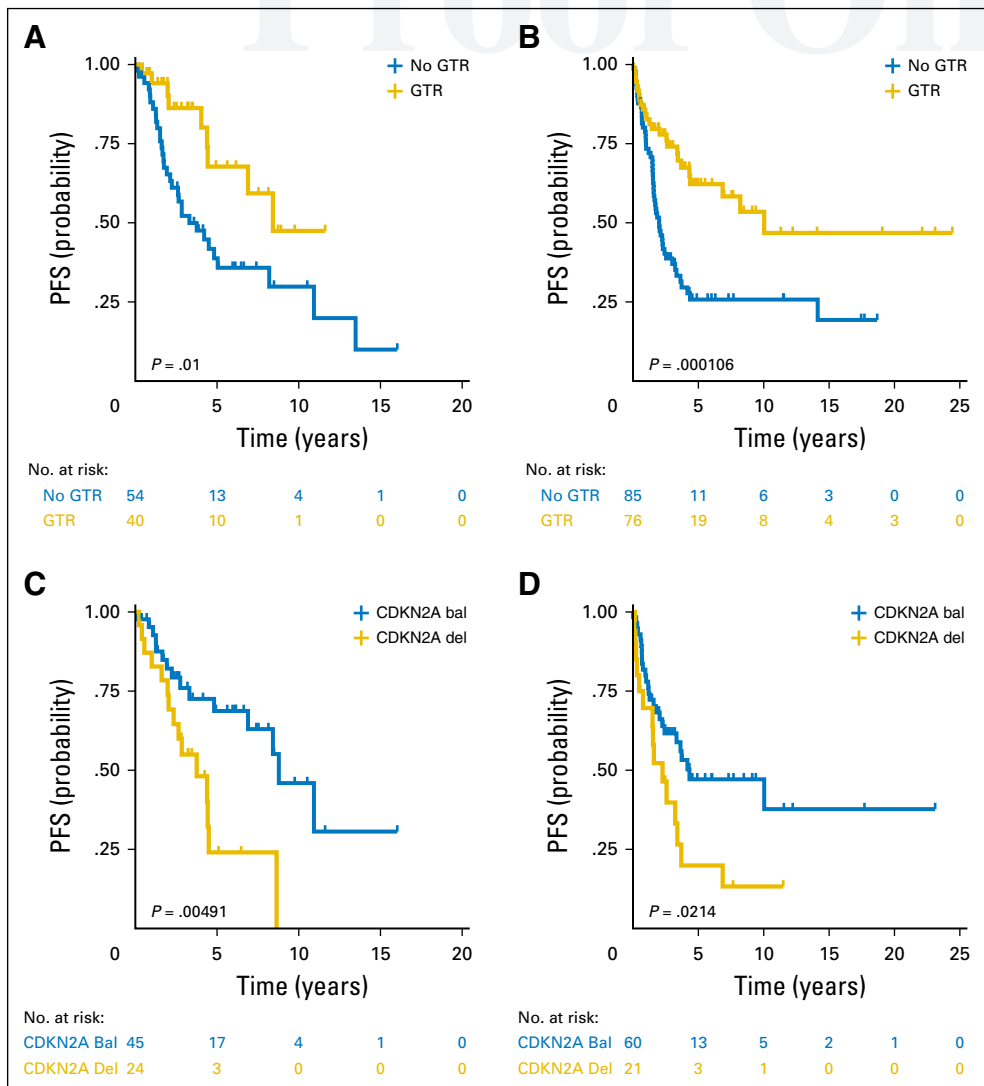


Fig 2. Survival of patients with BRAF V600E pediatric low-grade glioma according to the extent of resection and CDKN2A deletion. (A) Progression-free survival (PFS) of the BRAF V600E SickKids' cohort according to the extent of resection. (B) PFS for the BRAF V600E independent cohort according to the extent of resection. (C) PFS for the BRAF V600E SickKids' cohort according to CDKN2A status. (D) PFS for the BRAF V600E independent cohort according to CDKN2A status. *P* values were determined using the log-rank test. GTR, gross total resection; bal, balanced; del, deleted.

are often not biopsied, and medical therapy (radiation and chemotherapy) is initiated blindly under the assumption that all PLGGs will have similar outcome.²⁶⁻²⁸ Furthermore, because in some cases a gray zone exists between low-grade and high-grade glioma in children, and a histopathologic definition is not universally suitable to distinguish these, molecular analysis adds an important dimension to the approach for such tumors. Together, as BRAF V600E represents a clinically distinct subgroup of PLGG, current approaches toward the need for biopsy and molecular testing in PLGG should be re-evaluated.

Overall, our data suggest that BRAF V600E and CDKN2A deletion constitute a distinct clinical entity within PLGG. First, as observed in both the SickKids' cohort and independent cohort (Fig 2), these tumors are relentless and tend to recur multiple times, which results in poor outcome, which is dissimilar to other PLGGs. Extensive clinical follow-up enabled through the Ontario databases allows for the capture of late deaths observed in patients with BRAF V600E PLGG. These represent a major burden that extends from childhood to adult survivors of PLGG.¹⁵ These late deaths are attributed to late progression and tumor transformation up to 25

years after initial diagnosis.¹¹ Second, BRAF V600E PLGGs represent a distinct entity in their poor outcome after current conventional therapies. After complete resection, typical PLGGs do not need additional treatment—only 5% of WT tumors with GTR in the SickKids cohort recurred. One third of BRAF V600E PLGG in which GTR was achieved recurred in both the SickKids' cohort and independent cohort (Figs 2A and 2B), which suggests different tumor invasiveness.

For PLGG as a whole, outcome after radiation and chemotherapy is associated with PFS > 80% and 50%, respectively, at 5 years in PLGG series.^{27,29,30} In contrast, the present experience shows that BRAF V600E PLGGs have < 50% and 35% PFS after radiation and chemotherapy, respectively, at 5 years (Appendix Fig A1). Together, this suggests a different tumor type.

CDKN2A alterations are common in many adult cancers, including gliomas.^{12,13} It allows for a bypass of cell cycle arrest, which would normally be initiated by RAS pathway oncogenic activation.¹⁴ In contrast to adult gliomas, TP53 mutations are uncommon in PLGGs; therefore, CDKN2A alterations may play an important role in the behavior of some of these tumors. In this

Table 2. Multivariable Analysis

Variable	HR	95% CI	P
SickKids' discovery cohort			
PFS			
BRAF V600E	1.5964	1.0054 to 2.535	.0474
CDKN2A deleted	1.4882	0.9203 to 2.406	.1050
Age	0.9682	0.9251 to 1.013	.1657
Subtotal resection	6.3849	3.7810 to 10.782	4.05×10^{-12}
Female gender	1.2525	0.8472 to 1.852	.259
Grade 2	1.2084	0.6020 to 2.426	.5944
OS			
BRAF V600E	1.1278	0.62 to 2.051	.6936
CDKN2A deleted	0.9681	0.4946 to 1.895	.9246
Age	0.9604	0.9161 to 1.007	.0940
Subtotal resection	6.4670	3.8284 to 10.924	2.98×10^{-12}
Female gender	1.2235	0.8283 to 1.807	.3108
Grade 2	1.0232	0.5005 to 2.092	.9499
BRAF V600E: CDKN2A	3.2550	1.1332 to 9.35	.0284
Independent cohort			
PFS			
CDKN2A deleted	2.283	1.25 to 4.170	.00722
Subtotal resection	1.950	1.091 to 3.484	.02414
OS			
CDKN2A deleted	4.342	1.0659 to 17.688	.0405
Subtotal resection	1.954	0.4611 to 8.279	.3633

Abbreviations: HR, hazard ratio; PFS, progression-free survival; OS, overall survival.

study, *CDKN2A* deletion conferred poor outcome for patients with PLGG who harbored the BRAF V600E mutation. The prognostic value of this alteration was confirmed in the independent cohort.

Combining V600E, *CDKN2A*, and the extent of resection, we are able to define a high-risk group of PLGG with < 10% chance of tumor control and poor survival with conventional therapies. These survival curves are not observed in other PLGGs, and novel therapies should be considered for these patients.

Analysis of tumor response within 6 months of initiation in those who received chemotherapy provided important insight into the clinical behavior of BRAF V600E PLGG. A significant proportion of these patients had to switch to other chemotherapy

regimens or radiation at 6 months as a result of tumor progression. This is rarely observed with current PLGG protocols.^{17,27} Although the numbers are small and should still be considered anecdotal, all six patients who were treated with a BRAF V600E inhibitor achieved a response, with volumetric shrinkage of 49% to 80% with this targeted therapy. This objective response is encouraging in view of previous data. Of note, remarkable clinical improvement was observed in all these heavily pretreated patients.³¹

Results of clinical trials that used BRAF V600E inhibitors in patients with PLGG are pending; however, several case reports have already shown activity of BRAF V600E inhibitors in children with PLGG.³¹⁻³⁵ Although longer follow-up is required to determine emerging resistance and long-term adverse effects of these drugs, the rapid responses observed with these therapies in patients with BRAF V600E PLGG are encouraging and can potentially prevent ongoing sequelae, such as visual loss and neurologic deterioration, which are commonly observed with current therapies.

Taken together, these data reveal that BRAF V600E PLGGs are distinct from other PLGGs and require a different short-term and long-term therapeutic approach. Upfront diagnosis of these tumors is needed to define prognosis and a decision whether to include aggressive surgery and early targeted therapies for these patients. Finally, this study highlights the need for a change in our overall approach to PLGGs. Consideration for upfront biopsy and molecular diagnosis of deeply located midline tumors that are commonly treated without histologic confirmation will allow for better tailoring of therapeutic interventions and better outcome for these children in the era of precision medicine.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at jco.org.

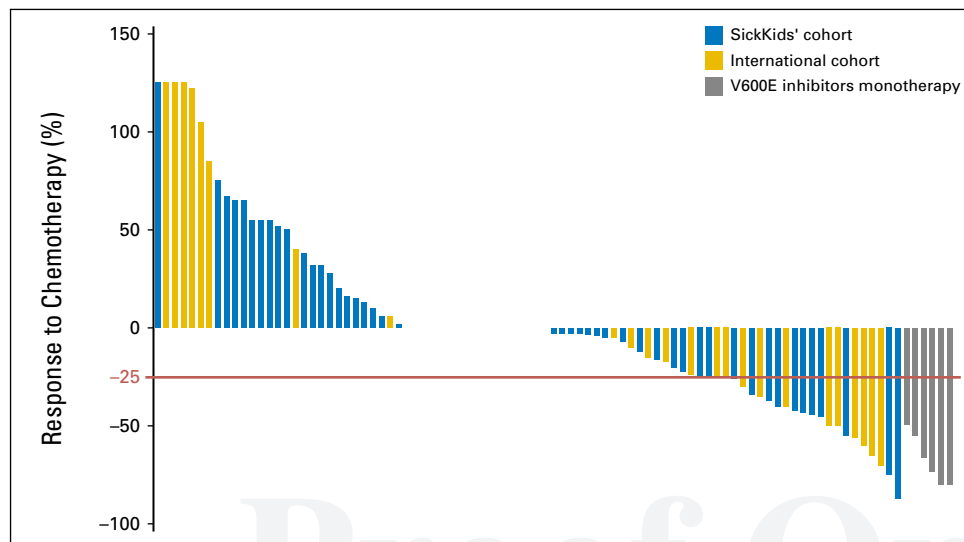


Fig 3. Response of patients with BRAF V600E pediatric low-grade glioma to chemotherapy and BRAF V600E inhibition. Waterfall plot of response to chemotherapy at 6 months. Note the response to BRAF V600E inhibitors in gray. PFS, progression-free survival.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Rahul Krishnatty, Ana Guerreiro Stucklin, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, Uri Tabori

Provision of study materials or patients: Romain Perbet, Adam Fleming

Collection and assembly of data: Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Marion Honnorat, Rahul Krishnatty, Ana Guerreiro Stucklin, Nataliya Zhukova, Anthony Arnoldo, Scott Ryall, Catriona Ling, Tara McKeown, Jim Loukides, Ofelia Cruz, Carmen de Torres, Cheng-Ying Ho, Roger J. Packer, Ruth Tatevossian, Ibrahim Qaddoumi, Julie H. Harreld, James D. Dalton, Jean Mulcahy-Levy, Nicholas Foreman, Matthias A. Karajannis, Shiyang Wang, Matija Snuder, Amulya Nageswara Rao, Caterina Giannini, Mark Kieran, Keith L. Ligon, Maria Luisa Garre, Paolo Nozza, Samantha Mascelli, Alessandro Raso,

Sabine Mueller, Theodore Nicolaides, Karen Silva, Romain Perbet, Alexandre Vasiljevic, Cécile Faure Conter, Didier Frappaz, Sarah Leary, Courtney Crane, Aden Chan, Ho-Keung Ng, Zhi-Feng Shi, Ying Mao, Elizabeth Finch, David Eisenstat, Bev Wilson, Anne Sophie Carret, Peter Hauser, David Sumerauer, Lenka Krskova, Valerie Larouche, Adam Fleming, Shayna Zelcer, Nada Jabado, James T. Rutka, Peter Dirks, Michael D. Taylor, Ute Bartels, Annie Huang, David W. Ellison, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, Uri Tabori

Data analysis and interpretation: Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Ana Guerreiro Stucklin, Catriona Ling, Carmen de Torres, Shiyi Chen, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, Uri Tabori

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

REFERENCES

- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al: CBTUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncol* 17:iv1-iv62, 2015 (Suppl 4)
- Sievert AJ, Fisher MJ: Pediatric low-grade gliomas. *J Child Neurol* 24:1397-1408, 2009
- Bergthold G, Bandopadhyay P, Bi WL, et al: Pediatric low-grade gliomas: How modern biology reshapes the clinical field. *Biochim Biophys Acta* 1845:294-307, 2014
- Jones DT, Hutter B, Jäger N, et al: Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 45:927-932, 2013
- Zhang J, Wu G, Miller CP, et al: Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 45:602-612, 2013
- Bergthold G, Bandopadhyay P, Hoshida Y, et al: Expression profiles of 151 pediatric low-grade gliomas reveal molecular differences associated with location and histological subtype. *Neuro-oncol* 17:1486-1496, 2015
- Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, et al: Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol* 12:913-922, 2011
- Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, et al: Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. *Neuro-oncol* 14:777-789, 2012
- Dahiya S, Haydon DH, Alvarado D, et al: BRAF (V600E) mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathol* 125:901-910, 2013
- Ho CY, Mobley BC, Gordish-Dressman H, et al: A clinicopathologic study of diencephalic pediatric low-grade gliomas with BRAF V600 mutation. *Acta Neuropathol* 130:575-585, 2015
- Mistry M, Zhukova N, Merico D, et al: BRAF mutation and CDKN2A deletion define a clinically distinct subgroup of childhood secondary high-grade glioma. *J Clin Oncol* 33:1015-1022, 2015
- Berg M, Nordgaard O, Körner H, et al: Molecular subtypes in stage II-III colon cancer defined by genomic instability: Early recurrence-risk associated with a high copy-number variation and loss of RUNX3 and CDKN2A. *PLoS One* 10:e0122391, 2015
- Alhajjaily A, Day AG, Feilottter HE, et al: Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res* 20:1676-1686, 2014
- Jacob K, Quang-Khuong DA, Jones DT, et al: Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res* 17:4650-4660, 2011
- Krishnatty R, Zhukova N, Guerreiro Stucklin AS, et al: Clinical and treatment factors determining long-term outcomes for adult survivors of childhood low-grade glioma: A population-based study. *Cancer* 122:1261-1269, 2016
- Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al: BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 17:4790-4798, 2011
- Lassaletta A, Scheinmann K, Zelcer SM, et al: Phase II weekly vinblastine for chemotherapy-naïve children with progressive low-grade glioma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 34:3537-3543, 2016
- Bouffet E, Jakacki R, Goldman S, et al: Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol* 30:1358-1363, 2012
- Ryall S, Krishnatty R, Arnoldo A, et al: Targeted detection of genetic alterations reveal the prognostic impact of H3K27M and MAPK pathway aberrations in paediatric thalamic glioma. *Acta Neuropathol Commun* 4:93, 2016
- Abraham J, Stenger M: Dabrafenib in advanced melanoma with BRAF V600E mutation. *J Community Support Oncol* 12:48-49, 2014
- Schindler G, Capper D, Meyer J, et al: Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:397-405, 2011
- Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, et al: Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro-oncol* 12:621-630, 2010
- Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, et al: BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: Diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One* 6:e17948, 2011
- Qaddoumi I, Orisme W, Wen J, et al: Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. *Acta Neuropathol* 131:833-845, 2016
- Dimitriadis E, Alexiou GA, Tsotsou P, et al: BRAF alterations in pediatric low-grade gliomas and mixed neuronal-glial tumors. *J Neurooncol* 113:353-358, 2013
- Gururangan S, Fisher MJ, Allen JC, et al: Temozolomide in children with progressive low-grade glioma. *Neuro-oncol* 9:161-168, 2007
- Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al: Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 30:2641-2647, 2012
- Packer RJ, Lange B, Ater J, et al: Carboplatin and vincristine for recurrent and newly diagnosed low-grade gliomas of childhood. *J Clin Oncol* 11:850-856, 1993
- Packer RJ, Ater J, Allen J, et al: Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low-grade gliomas. *J Neurosurg* 86:747-754, 1997
- Merchant TE, Li C, Xiong X, et al: Conformal radiotherapy after surgery for paediatric ependymoma: A prospective study. *Lancet Oncol* 10:258-266, 2009
- Lassaletta A, Guerreiro Stucklin A, Ramaswamy V, et al: Profound clinical and radiological response to BRAF inhibition in a 2-month-old diencephalic child with hypothalamic/chiasmatic glioma. *Pediatr Blood Cancer* 63:2038-2041, 2016
- Rush S, Foreman N, Liu A: Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol* 31:e159-e160, 2013
- del Bufalo F, Carai A, Figà-Talamanca L, et al: Response of recurrent BRAFV600E mutated ganglioglioma to vemurafenib as single agent. *J Transl Med* 12:356, 2014
- Skrypek M, Foreman N, Guillaume D, et al: Pilomyxoid astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 61:2099-2100, 2014
- Aguilera D, Janss A, Mazewski C, et al: Successful retreatment of a child with a refractory brainstem ganglioglioma with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 63:541-543, 2016

Affiliations

Alvaro Lassaletta, Michal Zapotocky, Matthew Mistry, Vijay Ramaswamy, Marion Honnorat, Rahul Krishnatry, Ana Guerreiro Stucklin, Nataliya Zhukova, Anthony Arnoldo, Scott Ryall, Catriona Ling, Tara McKeown, Jim Loukides, James T. Rutka, Peter Dirks, Michael D. Taylor, Shiyi Chen, Ute Bartels, Annie Huang, Eric Bouffet, Cynthia Hawkins, and Uri Tabori, The Hospital for Sick Children, Toronto; **Adam Fleming**, McMaster Children's Hospital, McMaster University, Hamilton; **Shayna Zelcer**, Children's Hospital of Western Ontario, London, Ontario; **David Eisenstat** and **Bev Wilson**, Stollery Children's Hospital, University of Alberta, Edmonton, Alberta; **Anne Sophie Carret**, Hospital Sainte Justine; **Nada Jabado**, McGill University, Montreal; **Valerie Larouche**, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec City, Quebec, Canada; **Ofelia Cruz** and **Carmen de Torres**, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; **Cheng-Ying Ho**, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD; **Roger J. Packer**, Children's National Health System, Washington, DC; **Ruth Tatevossian**, **Ibrahim Qaddoumi**, **Julie H. Harreld**, **James D. Dalton**, and **David W. Ellison**, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN; **Jean Mulcahy-Levy** and **Nicholas Foreman**, Children's Hospital Colorado, Aurora, CO; **Matthias A. Karajannis**, **Shiyang Wang**, and **Matija Snuderl**, New York University Langone Medical Center, New York, NY; **Amulya Nageswara Rao** and **Caterina Giannini**, The Mayo Clinic, Rochester, MN; **Mark Kieran** and **Keith L. Ligon**, Dana-Farber Cancer Institute, Boston Children's Hospital, Boston, MA; **Maria Luisa Garre**, **Paolo Nozza**, **Samantha Mascelli**, and **Alessandro Raso**, Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy; **Sabine Mueller** and **Theodore Nicolaides**, University of California, San Francisco, San Francisco, CA; **Karen Silva** and **Romain Perbet**, Hospices Civils de Lyon; **Alexandre Vasiljevic**, **Cécile Faure Conter**, and **Didier Frappaz**, Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Lyon, France; **Sarah Leary** and **Courtney Crane**, Seattle Children's Hospital, Seattle, WA; **Aden Chan** and **Ho-Keung Ng**, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong; **Zhi-Feng Shi** and **Ying Mao**, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, People's Republic of China; **Elizabeth Finch**, University of North Carolina, School of Medicine, Chapel Hill, NC; Peter Hauser, Semmelweis University, Budapest, Hungary; and **David Sumerauer** and **Lenka Krskova**, University Hospital Motol, Charles University, 2nd Medical School, Prague, Czech Republic.

Support

Supported by grants from the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics Institute (OGI-121); A Kid's Brain Tumor Cure/PLGA Foundation; the Making Headway Foundation; the Brain Tumour Research Assistance and Information Network; Meagan's Walk Fellowship in Pediatric Neuro-Oncology; Restrcomp Scholarship and Fellowship funds from the Garron Family Chair in Childhood Cancer Research at The Hospital for Sick Children (A.L. and M.Z.); a fellowship sponsored by the Society of Neuro-Oncology as an international research development grant (R.K.); National Institutes of Health, National Cancer Institute Grant No. K08-CA193982 (J.M.); the Fondazione Guido Berlucchi (M.L.G.). The French Groupe d'Étude de Neuropathologie Oncologique Pédiatrique network is supported by the Institut National du Cancer (Reference No. 2013-113), and the Italian group was supported by the Associazione Italiana per la Ricerca dei Tumori Cerebrali del Bambino.

Prior Presentation

Presented at the 2016 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, June 3-7, 2016, and the 17th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology. Liverpool, United Kingdom, June 12-16, 2016.



AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/jco/site/ifc.

Alvaro Lassaletta

Consulting or Advisory Role: Mundipharma

Travel, Accommodations, Expenses: Takeda, Shire

Michal Zapotocky

No relationship to disclose

Matthew Mistry

No relationship to disclose

Vijay Ramaswamy

No relationship to disclose

Marion Honnorat

No relationship to disclose

Rahul Krishnatry

No relationship to disclose

Ana Guerreiro Stucklin

No relationship to disclose

Nataliya Zhukova

No relationship to disclose

Anthony Arnoldo

No relationship to disclose

Scott Ryall

No relationship to disclose

Catriona Ling

No relationship to disclose

Tara McKeown

No relationship to disclose

Jim Loukides

No relationship to disclose

Ofelia Cruz

No relationship to disclose

Carmen de Torres

No relationship to disclose

Cheng-Ying Ho

No relationship to disclose

Roger J. Packer

No relationship to disclose

Ruth Tatevossian

No relationship to disclose

Ibrahim Qaddoumi

No relationship to disclose

Julie H. Harreld

No relationship to disclose

James D. Dalton

No relationship to disclose

Jean Mulcahy-Levy

No relationship to disclose

Nicholas Foreman

No relationship to disclose

Matthias A. Karajannis

Research Funding: Novartis, Pfizer

Shiyang Wang

No relationship to disclose

Matija Snuderl

Stock or Other Ownership: Epizyme, Arca Bioharma, Bluebird Bio, Catalyst Pharmaceuticals, Cellceutix, Geron, Ionis Pharmaceuticals, NanoString Technologies, Acceleron Pharma

Amulya Nageswara Rao

No relationship to disclose

Caterina Giannini

No relationship to disclose

Mark Kieran

Consulting or Advisory Role: Novartis, Bayer, Boehringer Ingelheim, Sigma-Tau, Merck

Speakers' Bureau: Merck Sharp & Dohme

Travel, Accommodations, Expenses: Merck Sharp & Dohme

Keith L. Ligon

Stock or Other Ownership: Travera

Research Funding: Plexxikon (Inst), Amgen (Inst), X4 Pharma (Inst), Tragara (Inst)

Patents, Royalties, Other Intellectual Property: Molecular diagnostics assay patent

Maria Luisa Garre

No relationship to disclose

Paolo Nozza

No relationship to disclose

Samantha Mascelli

No relationship to disclose

Alessandro Raso

No relationship to disclose

Sabine Mueller

No relationship to disclose

Theodore Nicolaides

No relationship to disclose

Karen Silva

No relationship to disclose

Romain Perbet

No relationship to disclose

Alexandre Vasiljevic

No relationship to disclose

Cécile Faure Conter

No relationship to disclose

Didier Frappaz

Consulting or Advisory Role: Bristol-Myers Squibb

Sarah Leary

No relationship to disclose

Courtney Crane

No relationship to disclose

Aden Chan

No relationship to disclose

Ho-Keung Ng

No relationship to disclose

Zhi-Feng Shi

No relationship to disclose

Ying Mao

No relationship to disclose

Elizabeth Finch

No relationship to disclose

David Eisenstat

No relationship to disclose

Bev Wilson

No relationship to disclose

Anne Sophie Carret

No relationship to disclose

Peter Hauser

No relationship to disclose

David Sumerauer

No relationship to disclose

Lenka Krskova

No relationship to disclose

Valerie Larouche

No relationship to disclose

Adam Fleming

No relationship to disclose

Shayna Zelcer

No relationship to disclose

Nada Jabado

No relationship to disclose

James T. Rutka

No relationship to disclose

Peter Dirks

No relationship to disclose

Michael D. Taylor

No relationship to disclose

Shiyi Chen

No relationship to disclose

Ute Bartels

No relationship to disclose

Annie Huang

No relationship to disclose

David W. Ellison

No relationship to disclose

Eric Bouffet

Research Funding: Genentech, Bristol-Myers Squibb

Cynthia Hawkins

Research Funding: Bayer

Travel, Accommodations, Expenses: Merck Canada

Uri Tabori

No relationship to disclose

Acknowledgment

Neuropathologic diagnosis for France's cases was performed by the Groupe d'Étude de Neuropathologie Oncologique Pédiatrique, and human biological samples and associated data were obtained from Cardiobiotec Biobank (CRB-HCL Hospices Civils de Lyon BB-0033-00046).

Appendix

METHODS

Patient Cohorts

This study was approved by the institutional review board of the Hospital for Sick Children (SickKids). By using our pediatric low-grade glioma (PLGG) database, we retrospectively identified 517 of 845 patients who were diagnosed at SickKids between 1985 and 2015 for whom both biopsy material and adequate clinical follow-up were available. In all patients, BRAF V600E mutation was analyzed. Subependymal giant-cell astrocytomas were excluded from the analysis (517 patients – seven patients with subependymal giant-cell astrocytomas = 510 patients). In those patients who received chemotherapy and had available studies and imaging (computed tomography and/or magnetic resonance imaging) were compared before initiation of treatment and at 6 months of receiving treatment to evaluate the response to chemotherapy for each treatment received. Progression was defined as the need for treatment change related to tumor growth (surgery, chemotherapy, or radiation) after imaging or clinical worsening. To be more accurate in the analysis of global incidence and the incidence according to location and pathology subtypes, we decided to include in this analysis only the total number of patients who were diagnosed from year 2000 (N = 449). We were able to obtain a BRAF mutation status for 90% of patients (n = 405).

Independent Cohort of BRAF V600E-Mutated PLGG

To validate our data of patients with BRAF V600E-mutations, we retrieved 180 patients with BRAF V600E-mutated PLGG from 18 collaborating centers from around the world. Clinical data collected included the same variables as in our cohort. In all samples received, BRAF V600E mutation was performed for confirmation and CDKN2A copy number status was also assessed by using the same methods as described for our cohort.

Statistical Analysis

To examine the prognostic effect of BRAF V600E, we constructed Cox proportional hazards regression models with and without BRAF V600E, along with other covariates, such as age, gross total resection, CDKN2A, grade, and gender. Concordance probability estimate was calculated as an indicator that assessed the overall value of a covariate in predicting a censored outcome and it was preferred over C-index in the Cox model context. In addition, logistic regression models were performed with and without BRAF V600E. Corresponding C-index values were calculated.

Biologic Studies.

Immunohistochemistry. Detection of BRAF V600E by immunohistochemistry was performed on our Benchmark Ventana Machine (XXXX) using the Optiview detection kit (XXXX). CC1 was used for heat retrieval for 40 minutes. Thirty-six minutes of incubation with the Mouse Anti-Human BRAF V600E Monoclonal Antibody from Spring Bioscience (XXXX). Casein was used for 8 minutes to help lessen some background staining and hematoxylin counterstain was used for 12 minutes. Slides were scored by a senior neuropathologist at SickKids (C.H.).

Nucleic Acid Isolation. DNA was first isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue using the MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (MC85200; Epicentre, XXXX) according to manufacturer instructions. Total RNA was extracted from FFPE tissue with the RNeasy FFPE extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) using manufacturer guidelines.

Droplet Digital PCR—Rare Event Detection. In this study, we used droplet digital (dd) PCR (Bio-Rad, Hercules, CA) to detect the somatic point mutation c.1799 C>T in the BRAF gene (p.V600E). The rare event detection assay for BRAF V600E was conducted according to manufacturer instructions. In brief, each 20-μL reaction mixture contained 50 ng DNA, 12.5 μL ddPCR Supermix for probes (no dUTP; Bio-Rad), 1.25 μL PrimePCR ddPCR mutation assay BRAF WT for p.V600E, Human (unique assay ID: dHsaCP2000028), 1.25 μL PrimePCR ddPCR mutation assay BRAF p.V600E, Human (unique assay ID: dHsaCP2000027), and 1 μL Fast Digest BsuRI (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, Waltham, MA). PCR reaction mixtures were partitioned into an emulsion of approximately 20,000 uniformly sized droplets. Droplets were then transferred to a 96-well PCR plate, heat sealed, and placed in a conventional thermal cycler (C1000 Touch Thermal Cycler; Bio-Rad). Thermal cycling conditions

were as follows: 95°C for 10 minutes, 39 cycles of 94°C for 30 seconds and 55°C for 60 seconds, 98°C for 10 minutes, and a 4°C hold. After PCR, the PCR plate was loaded on a QX100 droplet reader (QX100 System; Bio-Rad). Analysis of ddPCR data was performed with Quanta-Soft software (Version 1.6.6; Bio-Rad). Each tumor sample was run in technical duplicates.

ddPCR—Copy Number Variation. We also used ddPCR to assess copy number changes in the gene CDKN2A. The assay was performed similarly to the rare event detection assay. We used prime PCR ddPCR copy number assay CDKN2A (unique assay ID: dHsaCP1000581) and a reference prime PCR ddPCR copy number assay APB31 (unique assay ID: dHsaCP2500348). A known homozygous deleted cell line, AM38, was used as a zero-copy control, whereas an OPGP healthy control sample (ID: 85751) obtained from The Center of Applied Genomics at SickKids was used as a two-copy control.

Samples that showed < 1.4 copy number value as calculated from the total target and reference event number were considered deleted (concentration [copies/μL] of target/concentration [copies/μL] of reference × expected copy number of diploid genome 2). Each sample was run in technical duplicate, which yielded four data points. Final results were determined as the mean copy number of data points that belonged to both the target and reference genes. Thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 10 minutes, 39 cycles of 94°C for 30 seconds and 60°C for 60 seconds, 98°C for 10 minutes, and a 4°C hold.

NanoString—Detection of Fusion Transcripts. Probes that targeted KIAA1549-BRAF fusion variants were designed in collaboration with NanoString (Seattle, WA). Five hundred nanograms of total RNA was added to the nCounter Elements TagSet in hybridization buffer and incubated at 67°C for 20 hours. The sample was processed on the nCounter Preparation Station and the cartridge scanned at 555 fields of view on the nCounter Digital Analyzer. Raw counts were subjected to technical normalization by using counts obtained for positive control probe sets included in each run. The statistical outlier detection method was used to detect the presence of an expressed fusion. Data were viewed by using a box plot, and the presence of an extreme outlier (3× interquartile range) indicates fusion expression.

Fluorescent In Situ Hybridization. Fluorescent in situ hybridization was designed to detect transcripts by using BAC clones within the duplicated region at 7q34 (RP11-248P7 and RP11-837G3) and 7p12.1 control probes (RP11-478M17 and RP11-876P22). Probes were obtained from The Centre for Applied Genomics. The 7q34 clones were directly labeled with Spectrum Green fluorochrome and control clones were directly labeled with Spectrum Orange fluorochrome. Paraffin fluorescent in situ hybridization analysis was performed on 4-μm tumor sections. Slides were baked overnight to fix the section to the slide and were pretreated by using a paraffin pretreatment kit (Abbott, Chicago IL). Sections were dehydrated before slide/probe codenaturation on thermobrite (Intermedico, Markham, ON, Canada). Denaturation conditions used for paraffin-embedded slides/probes were as follows: 85°C for 7 minutes, followed by overnight incubation at 37°C. Slides were washed in ×0.4 side scatter/0.3% NP-40 at 73°C for 30 seconds, followed by ×2 side scatter/0.1% NP-40 at room temperature for 30 seconds. Slides were counterstained with DAPI. Nuclei were analyzed by using an Axioplan2 epifluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). Images were captured by an Axiocam MRm Camera (Imaging Associates, Bicester, United Kingdom) and analyzed by using an imaging system with Isis Software (Version 5.1.110; MetaSystems, Boston, MA).

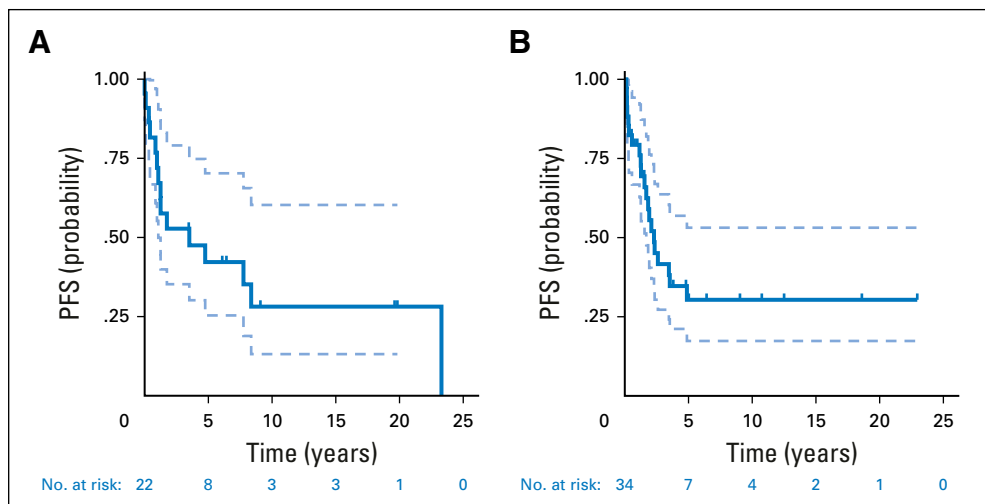


Fig A1. Progression-free survival (PFS) of patients from the SickKids' cohort who were treated with conventional therapies. (A) PFS for patients with BRAF V600E from the SickKids' cohort who were treated with radiation. (B) PFS for patients with BRAF V600E from the SickKids' cohort who were treated with chemotherapy. *P* values were determined by using the log-rank test.

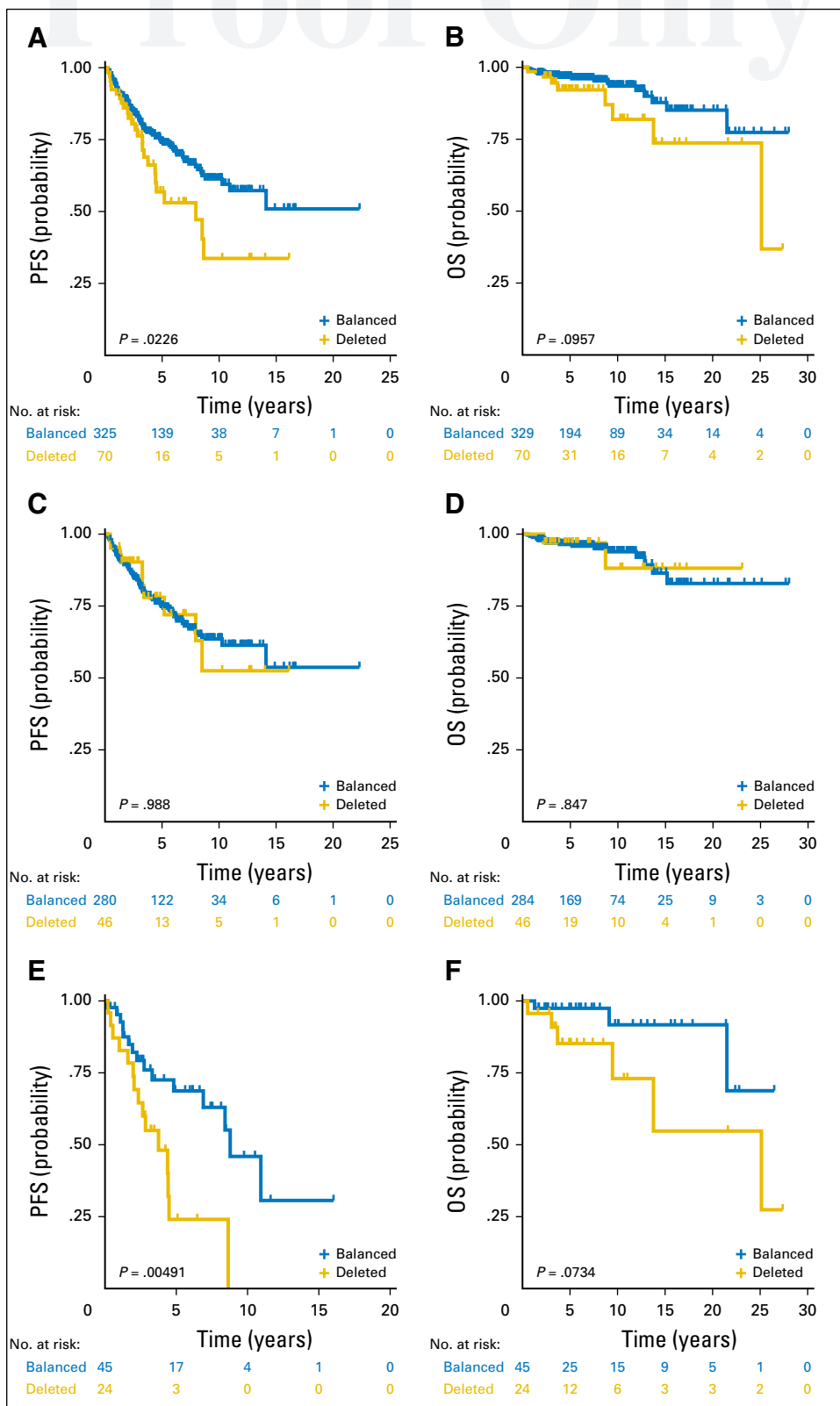


Fig A2. Survival of SickKids' patients stratified by *CDKN2A* status. (A) Progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) for all patients from the SickKids' cohort according to *CDKN2A* status. (C) PFS and (D) OS for patients from the SickKids' cohort with wild-type pediatric low-grade glioma (PLGG) according to *CDKN2A* status. (E) PFS and (F) OS for patients from the SickKids' cohort with BRAF V600E PLGG according to *CDKN2A* status. *P* values were determined by using log-rank test.

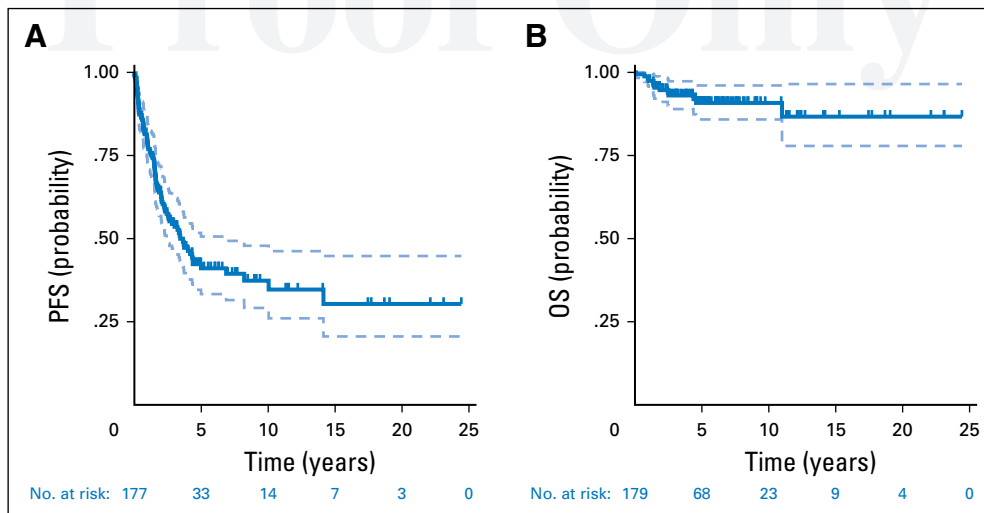


Fig A3. (A) Progression-free survival (PFS) for the BRAF V600E independent cohort. (B) Overall survival (OS) for the BRAF V600E independent cohort. *P* values were determined by using the log-rank test.

Table A1. BRAF V600E Mutated Patient Characteristics in the SickKids and Independent Cohorts

Characteristic	SickKids' Cohort (n = 99)	Independent Cohort (n = 180)
Gender, %		
Male/female	53/47	48/52
Median age, years (range)	9.23 (0.23-17.46)	9.33
Location, %		
Hemispheres	53.5	52.2
Midline	27.3	23.9
Cerebellar	5.1	11.1
Brainstem	11.1	9.4
Spine	3	0.6
Other		2.8
Diagnosis, %		
Pilocytic astrocytoma	12.1	17.2
Pilomyxoid astrocytoma	2	0.6
Ganglioglioma	33.3	32.8
PXA	10.1	18.9
Diffuse astrocytoma	10.1	6.7
LGG NOS	25.3	13.3
Others	7.1	10.5
OS: Median follow-up, years (range)	5.11 (0.05-27.37)	4.01 (0-24.43)
PFS: Median follow-up, years (range)	2.69 (0.01-16.03)	2.01 (0-24.43)
% of GTR	44.4	42.7
Received treatment other than surgery, %	40.4	42.2
Received radiation, %	22.2	23.8
Transformation, %	4	2.7

Abbreviations: GTR, gross total resection; LGG XXXX, low-grade glioma; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; PXA, pleomorphic xanthoastrocytoma.

ARTÍCULO 3

4.3.- ARTÍCULO 3

Título:

Profound clinical and radiological response to BRAF inhibition in a 2-month-old diencephalic child with hypothalamic/chiasmatic glioma.

Autores:

Lassaletta A, Guerreiro Stucklin A, Ramaswamy V, Zapotocky M, McKeown T, Hawkins C, Bouffet E, Tabori U.

Revista:

Pediatric Blood and Cancer. 2016 Nov;63(11):2038-41.

RESUMEN

Los lactantes con gliomas de bajo grado tienen un pronóstico desfavorable. La mutación BRAF V600E se ha identificado en esta población de pacientes. Sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ninguna experiencia de tratamiento con inhibidores de BRAF V600E en lactantes. Presentamos el caso de un lactante de 2 meses con un glioma de bajo grado localizado en la región quiasmática/hipotalámica que progresó con quimioterapia convencional con déficit visual grave, ascitis masiva y síndrome diencefálico. El inicio del tratamiento con dabrafenib resultó en una mejoría rápida y mantenida de los síntomas clínicos y una gran reducción del tamaño tumoral. La inhibición de BRAF V600E fue perfectamente tolerada por el paciente y se tradujo en una gran mejoría clínica y radiológica sugiriéndose que esta estrategia terapéutica es una opción viable en los lactantes con estos tumores. Es preciso realizar una reevaluación de los paradigmas en el tratamiento actual de estos pacientes para evaluar el gran potencial de los tratamientos dirigidos en esta población.

BRIEF REPORT

Profound clinical and radiological response to BRAF inhibition in a 2-month-old diencephalic child with hypothalamic/chiasmatic glioma

Alvaro Lassaletta^{1,2} | Ana Guerreiro Stucklin^{1,2,3} | Vijay Ramaswamy^{1,2,3} |
Michal Zapotocky^{1,2,3} | Tara McKeown¹ | Cynthia Hawkins^{2,3,4} | Eric Bouffet^{1,2,3} |
Uri Tabori^{1,2,3}

¹Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada

²The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada

³Developmental & Stem Cell Biology Program, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada

⁴Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Correspondence

Uri Tabori, Division of Hematology-Oncology, The Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, Toronto, ON M5G 1×8, Canada.
Email: uri.tabori@sickkids.ca

Alvaro Lassaletta and Ana Guerreiro Stucklin contributed equally to this work.

Grant sponsor: Garron Family Chair in Childhood Cancer Research at The Hospital for Sick Children; Grant sponsor: Megan's Walk Fellowship; Grant sponsor: Garron Family Cancer Center from the Hospital for Sick Children.

Abstract

Infants with low-grade glioma (LGG) have a poor survival. BRAFV600E mutation has been identified in pediatric LGG; however, the use of BRAF inhibitors in infants has never been reported. A 2-month-old with V600E mutant hypothalamic/chiasmatic glioma progressed on chemotherapy resulting in profound visual loss, massive ascites, and diencephalic syndrome. Initiation of dabrafenib resulted in rapid and sustained disappearance of clinical symptoms and a profound sustained cytoreduction. BRAF inhibition was safely tolerated with dramatic clinicoradiological response, suggesting early targeted therapy is a viable option in infants with LGG. A re-evaluation of current management paradigms in this population is warranted to leverage the potential benefit of upfront-targeted therapies.

KEYWORDS

dabrafenib, glioma, hypothalamic-chiasmatic, infant, low grade

1 | INTRODUCTION

Low-grade gliomas (LGGs) are the most common pediatric brain tumors.¹ Complete surgical excision is often sufficient for long-term survival²; however, many children with unresectable LGG require adjuvant therapy for long-term control. To date, most children receive chemotherapy in order to avoid or delay the long-term effects of radiotherapy. Unfortunately, several studies have identified that infants under the age of 1 year have poor functional and visual outcome compared to older children with these approaches.^{3–8} The role of biopsy in infants with optic pathway glioma is unclear as they are not amenable to surgical resection. As a consequence, most infants are not biopsied prior to treatment initiation and molecular data profiling is unavailable. Together, these data suggest that current management, regardless of the type of adjuvant chemotherapy regimen, is unlikely to confer a long-term benefit in this population and as such, novel molecularly based therapies are urgently required.

Herein, we report a young infant with a rapidly progressing hypothalamic-chiasmatic glioma with dramatic and sustained tumor response to BRAF inhibition resulting in complete reversal of life-threatening symptoms including visual recovery.

2 | CASE DESCRIPTION

A 2-month-old female presented with a 1-week history of pendular nystagmus, hypotonia, lethargy, and increasing head circumference. An ophthalmological assessment revealed only light perception with absent visual tracking. A cranial magnetic resonance imaging (MRI) revealed a massive contrast-enhancing suprasellar mass (40 × 39 × 60 mm) characterized by bilateral expansion of optic tracts, chiasm, and intracanalicular portion of the optic nerves and surrounding enhancing soft tissue, with associated mass effect and communicating hydrocephalus (Fig. 1A). Family history was noncontributory and she had no stigmata of neurofibromatosis type 1.

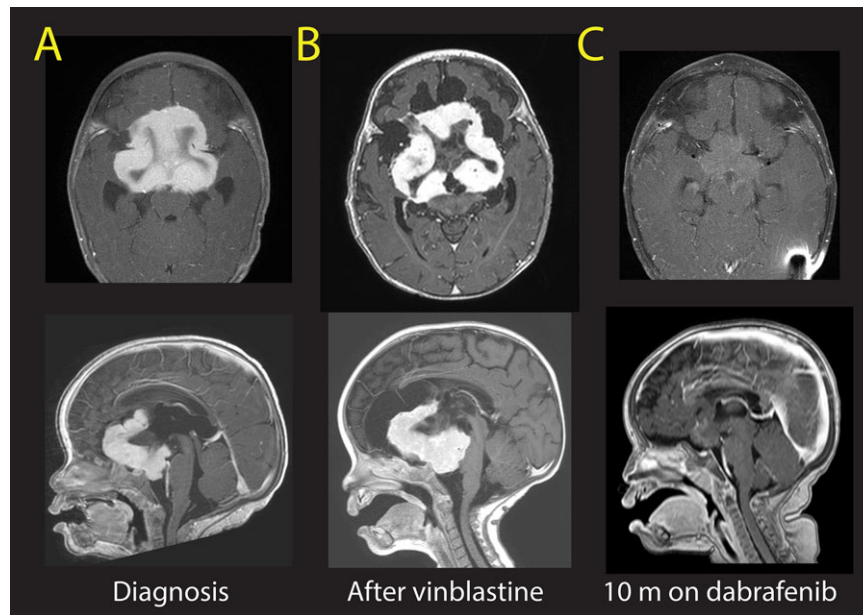


FIGURE 1 Cranial MRI (axial and sagittal T1 plus gadolinium) findings (suprasellar mass characterized by bilateral expansion of optic tracts, chiasm, and intracanalicular portion of the optic nerves) at diagnosis (A), after treatment with vinblastine (B), and after 10 months with dabrafenib (C)

An endoscopic biopsy was performed at the time of insertion of a programmable ventriculoperitoneal (VP) shunt. Histological examination revealed neoplastic glial cells showing mild nuclear pleomorphism and fibrillary cytoplasm, immunopositive for glial fibrillary acid protein. There were no mitoses, no evidence of necrosis or endothelial proliferation, and the MIB-1 proliferation index was low. All these findings were consistent with a LGG, WHO grade I. Tumor cells were immunoreactive for BRAFV600E; this result was confirmed by digital droplet PCR (41.2% mutation abundance).

Weekly vinblastine was initiated. However, within 1 week of treatment initiation, the patient developed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis and meningitis, as well as severe ascites with a bulging fontanelle. Her central venous catheter and VP shunt were removed. Vinblastine therapy was continued but not tolerable due to severe hyponatremia (Na 117 mmol/l) and neutropenia. The patient was no longer able to tolerate oral feeds. Further evaluation was consistent with a diagnosis of diencephalic syndrome including low weight (<3rd percentile) and high predicted resting energy expenditure (REE) of 162% despite preserved caloric intake. Severe ascites persisted requiring temporary placement of a peritoneal drain (cerebrospinal fluid protein >6 g/l). She further developed an extensive occlusive thrombus of the upper extremities and was started on low molecular weight heparin. Cranial MRI 40 days after diagnosis revealed marked progression of the suprasellar mass (81 × 72 × 66 mm) (Fig. 1B). Due to her rapidly progressive disease, clinical deterioration that resulted in a life-threatening status, and her extremely young age, no conventional therapies were deemed to be feasible. In light of her BRAFV600E mutation, after discussion with family, consent was obtained and a suspension formulation of dabrafenib therapy at a dose of 4.2 mg/kg/day was initiated on compassionate basis. Within 2 weeks of initiating dabrafenib (2 months from first diagnosis), the ascites improved dramatically and the peritoneal drain was

removed, her sodium levels normalized and she was discharged home tolerating oral feeds. Within a month, her nystagmus improved and she was able to fix and follow. Neuroimaging after 2 months revealed a 71% cytorreduction of her optic pathway mass as determined using T2/FLAIR measurements. The patient weight improved from the <3rd percentile to the 25–50th percentile and repeat calorimetry was performed showing a reduction of 30% of the REE compared to the baseline assessment. Sustained cytorreduction continued after 10 months (38 × 29 × 20 mm) (Fig. 1C). Vision has dramatically improved, and neurodevelopment and weight are now appropriate for age. Importantly, no significant side effects from the drug have been seen, other than moderate eczema, which was treated with topical agents.

3 | DISCUSSION

To our knowledge, this is the youngest child reported to be treated successfully for a hypothalamic-chiasmatic glioma with targeted BRAFV600E inhibitor therapy. In addition to a significant radiological response, she showed a dramatic clinical improvement.

Since the treatment of infantile nonresectable LGG consists of upfront chemotherapy regardless of pathological subtype, there are still controversies regarding the role of upfront biopsy in the management of these children. Several studies have pointed out the aggressive behavior of LGG in infancy.^{3–7} Since most of these infants will require multiple cycles of chemotherapy and other treatment modalities, the morbidity and long-term disabilities, specifically poor visual outcome associated with the tumor itself and its treatment, cannot be overstated. The high prevalence of targetable mutations in pediatric LGG^{9,10} opens a new window for early interventions in this population. This may affect both survival and long-term functional outcome in these children.

In the last 5 years, a major role for the RAS/RAF/MAPK pathway in the tumorigenesis of most pediatric LGG has been demonstrated.^{9,11–13} A recent report of diencephalic pediatric LGG reveals that 32% of BRAFV600E positive tumors are infants, portending to a poor outcome.¹⁴ Multiple BRAFV600E inhibitors exist and have shown significant but usually nonsustained responses in several adult cancers.¹⁵ Since pediatric LGG do not harbor similar genomic instability as these adult cancers, sustained response as seen in our patient could be expected. Indeed, several anecdotal reports have suggested promising and sustained efficacy in older children with low-grade BRAFV600E-mutated gliomas treated with specific BRAF inhibitors.^{16–20} Ongoing clinical trials are open across North America and Europe; however, these studies are limited to older children who can swallow capsules (ClinicalTrials.gov Identifier 1677741 and 1748149) or exclude patients <12 months of age. The combined feasibility, efficacy, and lack of short-term toxicity observed in this case are therefore encouraging. This suggests also that the exclusion of infants from these clinical trials should be reconsidered.

Visual improvement is rare in childhood optic pathway gliomas, especially when complete blindness is observed. This is possibly related to neuronal cell death due to retrograde axonal injury caused by continuous compression on the optic nerves and chiasm. The significant improvement of our patient's visual status further supports the potential role of early therapeutic intervention. Similarly, diencephalic syndrome is a rare but potentially fatal disorder observed in infants with hypothalamic-chiasmatic LGG. It is characterized by profound emaciation and failure to thrive despite preserved caloric intake and continued linear growth. Diencephalic syndrome has been reported as an adverse prognostic marker in pediatric LGG.⁷ Improvement and normalization of the metabolic status ensues over years.²¹ The rapid resolution of this patient's diencephalic syndrome upon initiation of dabrafenib is particularly impressive.

In summary, the poor prognosis and significant risk of long-term morbidity in infantile LGG should lead us to early consideration of targeted therapies at diagnosis. The use of rationale targeted therapies have the potential to alter the natural history of children with LGG; however, careful and robust clinical trials are needed prior to their routine use. Indeed, an area of concern is whether these responses will be sustained upon discontinuation of drug, analogous to what is observed in mTOR inhibition in tuberous sclerosis. Although historically infants with non-NF1 optic pathway glioma's have been diagnosed and treated based on radiological and clinical evaluation, a low threshold for biopsy particularly after failure of first-line therapy is warranted to leverage the potential of novel targeted therapies and prevent long-term sequelae seen often in this cohort of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from the Grant sponsor: Restramp from the Garron Family Chair in Childhood Cancer Research at The Hospital for Sick Children; Grant sponsor: Megan's Walk Fellowship; Grant sponsor: Garron Family Cancer Center from the Hospital for Sick Children Fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ABBREVIATIONS

LGG	low-grade glioma
MRI	magnetic resonance imaging
REE	resting energy expenditure
VP	ventriculoperitoneal

REFERENCES

1. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:83–103.
2. Wisoff JH, Sanford RA, Heier LA, et al. Primary neurosurgery for pediatric low-grade gliomas: A prospective multi-institutional study from the Children's Oncology Group. *Neurosurgery*. 2011;68:1548–1554; discussion 1554–1545.
3. Laithier V, Grill J, Le Deley MC, et al. Progression-free survival in children with optic pathway tumors: Dependence on age and the quality of the response to chemotherapy—results of the first French prospective study for the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol*. 2003;21:4572–4578.
4. Stokland T, Liu JF, Ironside JW, et al. A multivariate analysis of factors determining tumor progression in childhood low-grade glioma: A population-based cohort study (CCLG CNS9702). *Neuro Oncol*. 2010;12:1257–1268.
5. Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al. Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012;30:2641–2647.
6. Mirow C, Pietsch T, Berkefeld S, et al. Children <1 year show an inferior outcome when treated according to the traditional LGG treatment strategy: A report from the German multicenter trial HIT-LGG 1996 for children with low grade glioma (LGG). *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61:457–463.
7. Gnekow AK, Falkenstein F, von Hornstein S, et al. Long-term follow-up of the multicenter, multidisciplinary treatment study HIT-LGG-1996 for low-grade glioma in children and adolescents of the German Speaking Society of Pediatric Oncology and Hematology. *Neuro Oncol*. 2012;14:1265–1284.
8. Johnston DL, Keene D, Bartels U, et al. Low grade astrocytoma in children under the age of three years: A report from the Canadian pediatric brain tumour consortium. *J Neuro Oncol*. 2015;124:95–100.
9. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet*. 2013;45:602–612.
10. Qaddoumi I, Orisme W, Wen J, et al. Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors; BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. *Acta Neuropathol*. 2016;131:833–845.
11. Penman CL, Faulkner C, Lowis SP, Kurian KM. Current understanding of BRAF alterations in diagnosis, prognosis, and therapeutic targeting in pediatric low-grade gliomas. *Front Oncol*. 2015;5:54.
12. Jones DT, Hutter B, Jager N, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet*. 2013;45:927–932.
13. Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, et al. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:8188–8193.

14. Ho CY, Mobley BC, Gordish-Dressman H, et al. A clinicopathologic study of diencephalic pediatric low-grade gliomas with BRAF V600 mutation. *Acta Neuropathol.* 2015;130:575–585.
15. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 2015;372:30–39.
16. Rush S, Foreman N, Liu A. Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol.* 2013;31:e159–e160.
17. del Bufalo F, Carai A, Figa-Talamanca L, et al. Response of recurrent BRAFV600E mutated ganglioglioma to vemurafenib as single agent. *J Transl Med.* 2014;12:356.
18. Skrypek M, Foreman N, Guillaume D, Moertel C. Pilomyxoid astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:2099–2100.
19. Aguilera D, Janss A, Mazewski C, et al. Successful retreatment of a child with a refractory brainstem ganglioglioma with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63:541–543.
20. Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, et al. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol.* 2014;16:1408–1416.
21. Kilday JP, Bartels U, Huang A, et al. Favorable survival and metabolic outcome for children with diencephalic syndrome using a radiation-sparing approach. *J Neurooncol.* 2014;116:195–204.

TABLE 1. Infants with LGG and BRAF V600E mutation.

No	Age/Sex	Location	Treatment	Recur/ Prog.	Follow-up	Status	Vision (last assessment)	Other late sequelae
1	9m/F	OPG	STR, 2 lines CT (V+C and VBL)	Yes	18 years	ALIVE	Right eye: 6/120 Left eye: 2/200	Panhypopituitarism Seizures
2	5m/M	OPG	STR, 2 lines CT (V+C and PCV), focal XRT	Yes	17 years	ALIVE	Right eye: none Left eye: 20/80	Significant neurocognitive impairment. Hypothyroidism GH deficiency
3	9m/F	Suprasellar	STR + 5 lines CT (V+C; VBL; TMZ; TPCV; VBL)	Yes	16 years	ALIVE	Right eye: none Left eye: none	GH deficiency Premature ovarian failure Precocious puberty Seizures
4	5m/F	Disseminated OPG	8 lines CT (V+C; VBL; TPCV; TMZ; CIS+VP16; IMAT; VBL; VBL), STR after the first 2 lines of CT	Yes	13 years	DEAD	Right eye: none Left eye: 6/60	Seizures
5*	2m/F	OPG	Biopsy, 2 lines CT (VBL and DABRAFENIB ongoing)	Yes	9 months	ALIVE	On treatment	On treatment

OPG: optic pathway glioma; STR: subtotal resection; V+C: vincristine+carboplatin; VBL: vinblastine; PCV: procarbazine + CCNU + vincristine; XRT: radiation; CT: chemotherapy; GH: growth hormone; TMZ: temozolomide; TPCV: thioguanine+procarbazine+CCNU+vincristine; CIS: cisplatin; VP-16: etoposide; IMAT: imatinib.

*Case reported

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- NUEVOS TRATAMIENTOS EN GLIOMAS DE BAJO GRADO PEDIÁTRICOS

5.1.1.- Utilidad de los diferentes regímenes de quimioterapia y su toxicidad en el tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos

Durante los últimos 20 años se han publicado multitud de estudios que demuestran la eficacia de la quimioterapia en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado de nuevo diagnóstico o tras una progresión o refractariedad^{24,27,49,51,123}. La mayoría de estos estudios describen respuestas parciales o estabilización de la enfermedad en la mayoría de los pacientes tratados, hecho que hace factible la no administración de radioterapia o su retraso^{123,124,151-154}. En la tabla suplementaria 3 del artículo 1 se hace una revisión de los distintos regímenes de quimioterapia utilizados en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. El uso de la quimioterapia para el control del tumor a largo plazo es fundamental por varias razones y aporta un tratamiento efectivo disminuyendo los efectos secundarios de la radioterapia o de cirugías agresivas, no solo como tratamiento de primera línea, sino también como tratamientos sucesivos. Entre las combinaciones empleadas, la más aceptada a nivel universal es la combinación de vincristina y carboplatino, también llamada régimen de Packer, por su contribución a la misma^{24,154}. Independientemente de la secuencia de administración utilizada (mensual en la SIOP o semanal en el COG), esta combinación ha demostrado que el uso de la radioterapia puede ser demorado e incluso obviado en la mayoría de los casos. Sin

embargo, esta combinación continúa siendo subóptima en términos de progresión libre de enfermedad y de toxicidad^{24,124}. La tasa de progresión durante o al finalizar la quimioterapia es elevada y a los 5 años de iniciar el tratamiento, menos del 40% de los pacientes consiguen mantener la respuesta inicial¹²⁴. Además, muchos de los pacientes pediátricos no pueden completar todas las dosis de carboplatino debido a la alta tasa de reacciones alérgicas con este régimen (hasta un 32% en grandes estudios prospectivos¹⁵⁵) responsables de la interrupción del tratamiento en muchos casos antes de completarlo.

Se han utilizado numerosos regímenes de quimioterapia diferentes a la combinación de vincristina y carboplatino. Cada uno con sus limitaciones. Por ejemplo, el régimen TPCV (tioguanina, procarbicina, lomustina y vincristina) se asocia con una toxicidad importante hematológica además de un riesgo potencial no desdeñable de segundos tumores y un riesgo de infertilidad asociados a la lomustina y procarbicina^{51,127,128,156}. La combinación utilizada durante mucho tiempo por la sociedad francesa de oncología pediátrica (SFOP) incluía 6 fármacos con importantes riesgos de efectos secundarios a largo plazo, como ototoxicidad, leucemias secundarias, toxicidad renal crónica, neuropatía e infertilidad (cisplatino, etopósido, ciclofosfamida, procarbicina, vincristina y carboplatino)⁴⁹. La combinación etopósido + cisplatino utilizada por el grupo italiano se ha asociado a una pérdida significativa de audición, lo que en pacientes con gliomas de nervio óptico, que presentan con frecuencia déficit visual, conlleva una limitación importantísima para su vida diaria. También este régimen se ha asociado a un riesgo elevado de leucemia secundaria^{123,129,157}. La utilización de

temozolomida, se cuestiona debido a la falta de datos de su efectividad y de su toxicidad a largo plazo¹³⁰.

La radioterapia se ha utilizado tradicionalmente en los gliomas de bajo grado pediátricos que precisaran de tratamiento adyuvante tras la cirugía. Hasta hace muy poco se ha venido utilizando en primera línea de tratamiento tras la cirugía y aún hay muchos centros y algunos países que la continúan utilizando por delante de la quimioterapia. A pesar de que la radioterapia tiene una tasa mayor de progresión libre de enfermedad que la quimioterapia, los efectos secundarios incluyen deterioro neurocognitivo, alteraciones endocrinológicas y daños vasculares, sobre todo en pacientes de menor edad y en pacientes con neurofibromatosis¹¹⁵. La supervivencia a largo plazo de los pacientes irradiados se ha publicado en escasos estudios, y se ha asociado al desarrollo de segundos tumores y de complicaciones vasculares^{115,158,159}. Una publicación del grupo de Toronto que incluía una cohorte de 1202 pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado con una mediana de seguimiento de 12,73 años, demostró que en aquellos que sobrevivieron más de 5 años desde el diagnóstico, los que recibieron radioterapia como primera línea del tratamiento tenían un riesgo triplicado de fallecer a largo plazo y cuatro veces más riesgo de fallecer como consecuencia del tumor (mayor riesgo de malignización)⁹⁷.

5.1.2.- La experiencia de la vinblastina en el tratamiento de los gliomas de bajo grado pediátricos

Un régimen de quimioterapia alternativo pero también eficaz para los gliomas de bajo grado pediátricos es la administración de vinblastina en monoterapia. La vinblastina es un alcaloide que se extrae del bígaro de Madagascar "*Catharanthus Roseus*". Su mecanismo de acción es, como otros alcaloides, interrumpir el ciclo celular en la metafase al unirse a los microtúbulos y desestructurarlos durante la mitosis. Las respuestas terapéuticas demostradas con este fármaco no se pueden explicar 100% por este mecanismo de acción y se cree que esta quimioterapia tiene también un efecto antiangiogénico¹⁶⁰. La experiencia con la vinblastina en el campo de la oncología pediátrica está suficientemente contrastada. La vinblastina es o ha sido un componente básico en el tratamiento del linfoma de Hodgkin¹⁶¹, del linfoma anaplásico de células grandes^{162,163}, de la histiocitosis de células de Langerhans¹⁶⁴⁻¹⁶⁶, de los tumores desmoides¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ y de la fibromatosis agresiva¹⁶⁹. La experiencia con la vinblastina en el tratamiento de los distintos tumores pediátricos descritos anteriormente, nos permiten afirmar que la vinblastina semanal se tolera muy bien por los pacientes pediátricos y que su administración se puede prolongar con seguridad hasta 2 o 3 años. Los efectos secundarios más frecuentes de la vinblastina incluyen alopecia leve y en una proporción muy baja de pacientes, mielosupresión, náuseas moderadas y vómitos ocasionales. La mayoría de los pacientes no requieren tratamiento antiemético durante la administración de vinblastina. No existe evidencia de que la vinblastina

tenga efectos secundarios a largo plazo, a pesar de que se ha incluido en el listado de quimioterapias que pueden producir riesgo de infertilidad.

El grupo de Toronto tiene ya una dilatada experiencia en el uso de la vinblastina como tratamiento en los gliomas de bajo grado pediátricos. Inicialmente se realizó un estudio piloto en 11 pacientes que presentaron progresión tras vincristina y carboplatino y no fueron candidatos a radioterapia en ese momento. La vinblastina demostró una reducción del tamaño del tumor en 6 pacientes con muy poca toxicidad hematológica²⁸. Posteriormente se publicó una serie de 9 pacientes que habían tenido que suspender la combinación vincristina + carboplatino por presentar reacción alérgica al carboplatino y continuaron con vinblastina semanal. Todos los pacientes completaron el tratamiento con vinblastina y la tasa de respuesta global fue impactante (7/9 respuestas y ninguna progresión)¹³¹. Estos estudios se continuaron con un estudio fase II multicéntrico que completó la inclusión de pacientes en Junio de 2006 con 51 pacientes. En este estudio, los pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado eran candidatos al estudio si habían fracasado al tratamiento convencional con una o más líneas de tratamiento, incluyendo la radioterapia. La vinblastina se administró de forma semanal y a una dosis de 6 mg/m². Muchos pacientes, especialmente aquellos que habían sido tratados previamente de manera intensa precisaron ajuste de dosis por la toxicidad hematológica, sobre todo por neutropenia. La tasa de respuesta fue del 33% con el 75% de los pacientes habiendo completado el año de tratamiento con vinblastina semanal. Estos resultados fueron muy prometedores en su momento y confirmaban los resultados obtenidos en el estudio piloto. La

toxicidad de la vinblastina fue muy leve y ningún paciente requirió transfusiones ni de concentrado de hematíes ni de plaquetas²⁵. Tras realizar este estudio, el paso siguiente más lógico era realizar un ensayo clínico utilizando vinblastina semanal en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado, pero esta vez como primera línea de tratamiento.

En este ensayo clínico fase II se demuestra que la vinblastina en monoterapia tiene una actividad clínica y una supervivencia libre de progresión en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado de nuevo diagnóstico similar a otros regímenes de quimioterapia previamente utilizados, con mínima toxicidad y permitiendo a los pacientes mantener una buena calidad de vida durante el tratamiento.

5.1.3.- Progresión inicial de algunos tumores tratados con vinblastina

La actividad antiangiogénica de la vinblastina puede explicar la observación de que algunos tumores en tratamiento con vinblastina tengan un crecimiento inicial durante los primeros meses de tratamiento seguido de una reducción del tamaño tumoral posterior. Este hecho se ha descrito previamente con vinblastina y con otros regímenes de quimioterapia en gliomas de bajo grado pediátricos^{25,123}. En el estudio previo fase II de vinblastina en gliomas de bajo grado pediátricos con progresión o refractariedad, dos pacientes que presentaron progresión en la primera evaluación a los 3 meses del tratamiento presentaron una respuesta posterior. En este estudio, a pesar de que la progresión se tenía que confirmar en

dos RM consecutivas, 4 de los 6 pacientes que presentaron progresión en la RM de los 3 meses abandonaron el tratamiento por decisión de los investigadores locales. Los otros 2 pacientes que continuaron con la vinblastina semanal obtuvieron una respuesta tardía. La mediana de tiempo en la respuesta máxima en aquellos pacientes que respondieron fue de 52 semanas. Este dato sugiere que es necesaria la exposición prolongada a la vinblastina para que pueda actuar sobre el tumor y que se pueden observar buenas respuestas a pesar de una progresión inicial.

5.1.4.- Toxicidad de la vinblastina

La toxicidad del tratamiento con vinblastina fue mínima, permitiendo a la mayoría de los pacientes completar las 70 semanas del tratamiento (un paciente incluso prolongó el tratamiento durante dos años sin toxicidades reseñables). La toxicidad más frecuente e importante fue hematológica. La dosis inicial parece elevada, ya que sólo el 24% de los pacientes mantuvieron las dosis inicial de vinblastina (6 mg/m^2). La dosis fue reducida a 5 mg/m^2 en el 30% de los pacientes y a 4 mg/m^2 en el 31% de los pacientes. En todos los casos debido a neutropenia. Sólo 2 pacientes recibieron transfusión de concentrado de hematíes y ningún paciente recibió transfusión de plaquetas. El pronóstico fue similar independientemente de la dosis recibida. Por todo ello, la dosis inicial recomendada en los próximos ensayos clínicos con vinblastina será de 5 mg/m^2 . Las toxicidades más relevantes del estudio se exponen en la tabla 2 del primer artículo.

5.1.5.- Tasa de respuesta, supervivencia libre de progresión y resultado en la visión

La tasa de respuesta (definida por la suma de remisiones completas + remisiones parciales + respuesta mínima) fue del 25,9% que puede parecer algo baja cuando se compara con otros regímenes de quimioterapia. Sin embargo, cuando analizamos la tasa de estabilización de la enfermedad (remisión completa + remisión parcial + respuesta mínima + enfermedad estable) esta cifra aumenta al 87% de los pacientes. No se evidenció correlación alguna entre la respuesta del tumor y el control del tumor a largo plazo. Por tanto, sabiendo que algunos pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado van a requerir distintas líneas de tratamiento y que se ha observado una tasa similar de respuestas a regímenes de quimioterapia de primera, segunda e incluso líneas posteriores¹³⁹, el uso de vinblastina en primera línea estaría justificado como consecuencia de su baja toxicidad y buena tolerancia. Lo más importante para los pacientes con gliomas de bajo grado es mantener su tumor estabilizado para no sufrir las consecuencias del crecimiento tumoral. En este aspecto, la supervivencia libre de progresión en los pacientes de este estudio (definida como la necesidad de una segunda línea de tratamiento con quimioterapia o radioterapia) fue del 60%, totalmente comparable e incluso en el límite alto de otros regímenes de quimioterapia (tabla suplementaria 3 del primer artículo), pero con una toxicidad para el paciente mucho menor.

La respuesta al tratamiento de la agudeza visual y de las alteraciones campimétricas están muy poco valoradas en los ensayos clínicos y en los estudios

prospectivos publicados hasta la fecha en gliomas de bajo grado pediátricos. Es de reseñar que en este estudio, solo 4 de todos los pacientes evaluables para la respuesta visual (24 pacientes) presentaron empeoramiento de la visión durante el tratamiento. Estos resultados se pueden evaluar de manera favorable si se comparan con lo publicado en la literatura hasta la fecha¹⁷⁰.

5.1.6.- Pacientes con neurofibromatosis tipo I

Como ya se ha comentado en la introducción, hasta un 15-30% de los pacientes con NF-1 van a desarrollar un glioma de bajo grado¹⁶. La mayoría son gliomas de vías ópticas con histología de astrocitomas pilocíticos. En distintos estudios de quimioterapia, los pacientes con gliomas de bajo grado y NF-1 han demostrado tener mejor respuesta a los tratamientos que los pacientes que no presentan NF-1^{19,24-27,29,33,49,123,157,171,172}(tabla suplementaria 4 del primer artículo). Hasta la fecha, el tratamiento de primera elección que se utiliza en la mayor parte del mundo para los pacientes con NF-1 y gliomas de bajo grado es la combinación de carboplatino y vincristina. El grupo de Toronto ya demostró que tras una progresión o refractariedad de un paciente con NF-1 y glioma de bajo grado, la supervivencia libre de eventos a 5 años con vinblastina era superior en los pacientes con NF-1 que en aquellos que no tenían NF-1 (75,0±15% frente a 35,7±7,6%)²⁵. Administrando en este estudio la vinblastina en primera línea de tratamiento, también demostramos una mejor supervivencia libre de progresión a 5 años con un 85,1% (IC95%, 68-100%) en los pacientes con NF-1 comparado con un 42,0% (IC95%, 29,1-60,7%) en los pacientes sin NF-1 (p=0,012). Además, en

los pacientes que respondieron a la vinblastina, la mediana de tiempo a la respuesta para los pacientes con NF-1 fue de 25,5 semanas mientras que para los pacientes sin NF-1 fue de 52 semanas. Este dato, aunque no significativo podría sugerir que la respuesta es más rápida en los pacientes con neurofibromatosis.

5.1.7.- Pacientes mayores de 10 años

En la mayoría de los centros dedicados al tratamiento de estos tumores, la recomendación para los pacientes mayores de 10 años con gliomas de bajo grado irresecables es todavía la radioterapia como tratamiento de primera línea. La radioterapia, como ya se ha comentado en la introducción, provoca efectos secundarios significativos a largo plazo. Los primeros estudios de quimioterapia en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado se hicieron en niños pequeños, con diferentes cortes en la edad máxima permitida según los distintos grupos cooperativos (menores de 5 años en SIOP y menores de 10 años en algunos estudios de Norteamérica). El mayor estudio publicado hasta la fecha en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado randomizaba la combinación de vincristina y carboplatino, con la combinación TPCV (tioguanina, procarbicina, CCNU y vincristina), y sólo incluía pacientes menores de 10 años⁵¹. Sirva de ejemplo que el protocolo actual de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) aconsejaba, hasta hace muy poco, la radioterapia como tratamiento de primera línea en los pacientes mayores de 8 años que precisaran tratamiento tras la cirugía (SIOP-LGG 2004)¹²⁴. Sin embargo, estudios de los últimos años sugieren que los adolescentes pueden obtener un buen control de sus gliomas de bajo grado cuando

se tratan con quimioterapia¹⁷³⁻¹⁷⁵. Además, la información que estamos obteniendo de los estudios biológicos sugieren que algunos pacientes pediátricos mayores podrían tener gliomas de bajo grado con comportamiento menos agresivo^{63,176}. En nuestro estudio, el 43% de los pacientes eran mayores de 10 años. La tasa de respuesta, la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia libre de radioterapia fueron similares a los pacientes menores. Tampoco hubo diferencias respecto a la toxicidad. Esto es importante, porque este estudio demuestra que los pacientes mayores de 10 años con gliomas de bajo grado que precisen tratamiento más allá de la cirugía, pueden y deben recibir quimioterapia como primera línea de tratamiento, con el objetivo de no administrar o posponer el uso de la radioterapia.

5.1.8.- Estudios biológicos

Este es el primer ensayo clínico prospectivo que ha correlacionado la biología tumoral con los resultados. Como ya se ha explicado en la introducción, la alteración molecular más frecuente encontrada en los gliomas de bajo grado pediátricos implica a BRAF⁵⁴, un miembro distal de la familia serin-treonin-quinasa-RAS y un regulador clave de la vía proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) responsable de controlar la división, diferenciación e invasión celular. Los estudios moleculares han demostrado que la mayoría de los gliomas de bajo grado pediátricos presentan una fusión entre el dominio activador MAPK de BRAF y otro gen, el KIAA1549⁶². Algunas publicaciones han demostrado también que la fusión BRAF:KIAA1549 otorgaría a los gliomas de bajo grado pediátricos un fenotipo

menos agresivo y por lo tanto un pronóstico mejor⁶³. La mutación BRAF V600E, que resulta de la sustitución de una valina por ácido glutámico en el codon 600 del gen BRAF, es la mutación más frecuente en estos tumores. Algunos estudios han sugerido una peor supervivencia libre de progresión en los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E^{64,153} y un aumento del riesgo de transformación a gliomas de alto grado cuando asocian además la delección en CDKN2A^{66,177}. Con las limitaciones de una serie pequeña de pacientes, en el estudio no se observó ninguna implicación pronóstica que se correlacionara con el estado de BRAF en los pacientes. Debido a que en nuestro estudio, una proporción significativa de los pacientes no se biopsiaron (un 31% del total), el papel de las alteraciones de BRAF se recomienda sea estudiado en ensayos clínicos de mayor envergadura con mayor número de pacientes.

5.1.9.- Calidad de vida

Este es el primer ensayo clínico prospectivo que incluye la evaluación de la calidad de vida durante el tratamiento de pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. A los pacientes y/o a sus padres se les hizo el cuestionario “PedsQL Brain Tumor Module” que ha sido validado para menores entre 2 y 18 años y que consta de 24 ítems que identifican problemas cognitivos, dolor, movimiento y equilibrio, ansiedad, náuseas y preocupaciones¹⁷⁸. Demostramos en el estudio que en los pacientes en tratamiento con vinblastina no cambiaron las puntuaciones de la calidad de vida durante el tratamiento (tabla 1 del primer artículo). Además, aprendimos las limitaciones que tiene el hacer un estudio que incluya la evaluación

de la calidad de vida para estudios futuros: 1) el número de pacientes es pequeño; 2) la alta tasa de pacientes que no rellenan los cuestionarios y 3) las dificultades en evaluar la calidad de vida de los menores de 2 años, ya que no existen herramientas validadas para este rango de edad. A pesar de estas limitaciones, los resultados de este estudio son de gran valor para comparaciones futuras entre distintos regímenes de tratamiento en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado. Sabiendo que la mayoría de las quimioterapias que utilizamos en estos pacientes tienen la misma tasa de respuestas, se hace imprescindible escoger como tratamiento de primera y segunda línea aquellas que permitan a los pacientes mantener una buena calidad de vida durante el tratamiento. El tratamiento con vinblastina permite a los pacientes durante el mismo, seguir acudiendo a su colegio y continuar una vida completamente normal, excepto por el hecho de tener que acudir a su hospital una vez a la semana durante unos minutos para su administración de vinblastina semanal.

5.2.- AVANCES EN EL CONOCIMIENTO MOLECULAR DE LOS GLIOMAS DE BAJO GRADO PEDIÁTRICOS

Este estudio define las características de los gliomas de bajo grado pediátricos que presentan la mutación BRAF V600E. Para ello, se realizó de forma retrospectiva el análisis de la mutación BRAF V600E en todos aquellos gliomas de bajo grado en los que había muestra histológica de la cohorte del hospital SickKids de Toronto entre 1985 y 2015 (510 pacientes). Además se obtuvo una cohorte independiente internacional de 180 pacientes con gliomas de bajo grado que presentaban la mutación BRAF V600E.

5.2.1.- La mutación BRAF V600E es frecuente en los gliomas de bajo grado pediátricos

La mutación BRAF V600E se ha estudiado ampliamente en algunos tumores de la edad adulta como el melanoma, el carcinoma papilar de tiroides, el cáncer colorectal y el cáncer de pulmón, así como en algunos tumores pediátricos como la histiocitosis de células de Langerhans¹⁷⁹. Tras conocer esta información, algunos grupos estudiaron la incidencia de la mutación BRAF V600E en los tumores del sistema nervioso central¹⁸⁰⁻¹⁸². Estos estudios mostraron que esta mutación se encuentra sobre todo en los gliomas. Cuando se incluía el análisis de los gliomas pediátricos, la incidencia de BRAF V600E en los gliomas de alto grado era de aproximadamente el 10-15% de los casos y en los gliomas de bajo grado se describían incidencias altas en algunos subtipos histológicos como los

xantoastrocitomas pleomórficos (alrededor de un 65-70%) o los gangliogliomas (alrededor de un 15-35%). Hasta la fecha no se había hecho un análisis tan extenso estudiando una cohorte que incluyera todos los subtipos de gliomas de bajo grado pediátricos.

Para calcular la incidencia real de esta mutación en nuestra cohorte, decidimos analizar con este objetivo todos los tumores (no solo los que precisaron tratamiento tras la cirugía) recogidos entre los años 2000 y 2015, pues teníamos el estudio de la mutación realizado en el 90% de los casos (405/449). Podemos concluir que la incidencia de la mutación BRAF V600E en los gliomas de bajo grado pediátricos es del 17% (Tabla 1 del segundo artículo). Además, los tumores con la mutación se podían observar en todas las edades y en todas las localizaciones. De hecho, observamos una incidencia superior a la esperada de tumores con la mutación en la línea media. Globalmente, un 33% de los tumores mutados se originaron en la línea media, incluyendo el diencéfalo y el tronco cerebral. Este dato es fundamental, pues a veces los gliomas de bajo grado en estas localizaciones no se biopsian y se tratan de acuerdo con los hallazgos radiológicos. Esto significa que si no biopsiamos estos tumores, dejaremos de obtener una información muy valiosa sobre la biología del tumor, como por ejemplo, la detección de la mutación BRAF V600E y la posibilidad de tratamiento con un inhibidor de la misma.

Como esperábamos por las publicaciones previas^{67,74,80,182}, las incidencias más altas de la mutación se observaron en los xantoastrocitomas pleomórficos (78%) y en los gangliogliomas (45%). La incidencia en los gangliogliomas fue algo

más alta de los esperado, pues la literatura reflejaba entre un 15 y un 35% de casos^{65,67,80,181,182}. Lo más significativo de nuestros resultados en cuanto a los subtipos histológicos con la mutación es la incidencia de BRAF V600E en los astrocitomas difusos (43%) y otros astrocitomas grado I de la OMS (20%) (Tabla 1 del segundo artículo).

5.2.2.- Los gliomas pediátricos de bajo grado con la mutación BRAF V600E presentan mal pronóstico con los tratamientos convencionales

Para los análisis de supervivencia utilizamos los 510 pacientes de la muestra con una mediana de seguimiento de 7 años (rango, 0,01 – 28 años). La supervivencia libre de progresión (SLE) de los tumores con la mutación es significativamente peor que aquellos que no presentan la mutación. La SLE a 5 años y a 10 años para los tumores mutados fue del 50,1% (IC 95%, 38,1 a 62,1) y 27% (IC 95%, 12,1 a 41,9) respectivamente. La SLE a 5 y 10 años para los tumores sin la mutación fue del 72,8% (IC 95%, 67,9 a 77,7) y 60,2% (IC 95%, 53,3 a 67,1) respectivamente. Las diferencias fueron significativas ($p < 0,0001$). Estos resultados indican que aquellos gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E presentan un alto riesgo de progresión a pesar de los tratamientos convencionales y que van a requerir múltiples líneas de tratamiento durante muchos años después del diagnóstico. En cuanto a la supervivencia global, esta fue a los 10 años del 83,9% (IC 95%, 72,5 a 95,6) para los pacientes con la mutación y del 92,1% (IC 95%, 88,6 a 95,6) para aquellos que no presentaron la mutación. Esta diferencia no fue significativa ($p = 0,183$) (Figuras 1A y 1B del segundo artículo). Es importante

destacar que se observaron fallecimientos de pacientes con la mutación BRAF V600E hasta 25 años después del diagnóstico.

Para determinar por qué los gliomas de bajo grado pediátricos que presentan la mutación BRAF V600E tienen una evolución peor que aquellos sin la mutación, analizamos el efecto que tienen las distintas modalidades de tratamiento actuales: cirugía, radioterapia y quimioterapia.

5.2.2.1.- Respuesta a la cirugía de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E

En cuanto a la cirugía, normalmente los gliomas de bajo grado que alcanzan una resección quirúrgica completa no suelen recaer posteriormente. En nuestro estudio, a pesar de que en el 44,4% de los casos con la mutación BRAF V600E se obtuvo una resección quirúrgica completa, un número significativo de los pacientes progresó tras la cirugía. La supervivencia libre de progresión a los 5 años en los pacientes con la mutación BRAF V600E para los pacientes que obtuvieron una resección completa o no, fue del 67,8% (IC 95%, 46,8 a 88,8) y del 38,8% (IC 95%, 24,1 a 53,5) respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,01$) (Figura 2A del segundo artículo). Estas cifras contrastan claramente con los pacientes sin la mutación BRAF V600E, en los que la supervivencia libre de progresión a 5 años para los que obtuvieron o no una resección completa fue del 95,9% (IC 95%, 95,2 a 99,6) y 53,3% (IC 95%, 46 a 61,7) respectivamente ($p=8.18e^{-13}$). Estos hallazgos demuestran que los gliomas de

bajo grado pediátricos que presentan la mutación BRAF V600E tienen un comportamiento muy diferente en cuanto al dogma tradicional quirúrgico, que incluye que glioma de bajo grado con resección macroscópica completa es un glioma con mínimas posibilidades de progresión. Sin embargo, lo que estos resultados traducen es que ante un glioma de bajo grado con la mutación en el que obtengamos una resección completa, debemos mantener una vigilancia muy estrecha porque las posibilidades de recaída/progresión son importantes.

5.2.2.2.- Respuesta a la radioterapia de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E

El pronóstico de los gliomas de bajo grado pediátricos tratados con radioterapia se asocia en condiciones normales a una supervivencia libre de progresión a los 5 años del 80%¹⁰⁹. En nuestro estudio, el 24% de los pacientes con la mutación recibió radioterapia. La supervivencia libre de progresión a los 5 y 10 años tras la administración de radioterapia fue del 42,2% (IC 95%, 20,6 a 63,8) y 28,1% (IC 95%, 6,7 a 49,5) respectivamente. Estos resultados son claramente desfavorables y traducen una muy pobre respuesta a un tratamiento, que aunque actualmente se tiende a evitar por sus secuelas a largo plazo, es muy efectivo en el control de los gliomas de bajo grado pediátricos (figura suplementaria 1A del segundo artículo).

5.2.2.3.- Respuesta a la quimioterapia convencional de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E

El pronóstico de los gliomas de bajo grado pediátricos tratados con quimioterapia se asocia en condiciones normales a una supervivencia libre de progresión a los 5 años de aproximadamente el 50%^{51,154}. En nuestro estudio, el 32% de los pacientes con la mutación recibió quimioterapia. La supervivencia libre de progresión a los 5 años tras la administración de quimioterapia de primera línea fue del 30,4% (IC 95%, 13,3 a 47,5). Estos resultados reflejan que aproximadamente el 70% de los pacientes con la mutación van a precisar al menos de una segunda línea de tratamiento convencional (quimioterapia o radioterapia) en los 5 años que siguen al diagnóstico, y como se ha citado anteriormente, muchos de estos pacientes precisaran de más de dos líneas de tratamiento quimioterápico.

La mala evolución de los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E tras la cirugía, la quimioterapia y/o la radioterapia nos sugieren que estos tumores son muy diferentes al resto de los gliomas de bajo grado pediátricos.

5.2.3.- CDKN2A identifica un subgrupo de peor pronóstico dentro de los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E

El gen CDKN2A (también conocido como inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina A2) está localizado en el cromosoma 9p21.3. Codifica para dos proteínas, la proteína p16 (o p16INK4a) y la proteína p14arf. Ambas proteínas

actúan como genes supresores regulando el ciclo celular. La proteína p16 inhibe las quinasas 4 y 6 dependientes de ciclinas (CDK4 y CDK6) activando la familia retinoblastoma de proteínas que bloquean el ciclo celular de G1 a la fase S. La proteína p14ARF activa el gen supresor de tumores p53. Las mutaciones somáticas de CDKN2A son frecuentes en la mayoría de tumores en humanos y se estima que CDKN2A es el segundo gen más frecuentemente inactivado en el cáncer después del gen p53. En muchos tipos de tumores, las alteraciones en CDKN2A actúan como una alteración secundaria permitiendo a la célula tumoral “escapar” de la regulación del ciclo celular y aumentar su malignidad^{183,184}. En los gliomas pediátricos de bajo grado, la pérdida de CDKN2A se ha asociado al “escape” de la senescencia inducida por el oncogén¹⁸⁵ sobre todo cuando se combinan con mutaciones de BRAF. El grupo de Toronto había publicado previamente que los gliomas de bajo grado pediátricos que se transforman a gliomas de alto grado (2,9% de los casos) tienen una alta incidencia de la mutación BRAF V600E en combinación con la delección CDKN2A⁶⁶. Con esta información decidimos analizar CDKN2A en todos los casos posibles de nuestra cohorte para ver cual era el comportamiento de estos tumores.

El estado de CDKN2A fue realizado en 403 de las 510 muestras de nuestro hospital (SickKids, Toronto). En algunos tumores no se pudo obtener por muestra insuficiente o por no poder obtener DNA para la realización de la técnica. El 25% de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E y el 17% de los que no tenían la mutación presentaban una delección en CDKN2A. A pesar de que cuando se analizaron todos los casos, la delección de CDKN2A se asociaba a una peor

supervivencia global y una peor supervivencia libre de progresión, el impacto de esta alteración se concentraba en los casos con la mutación BRAF V600E (figura suplementaria 2 del segundo artículo). La supervivencia libre de progresión a 5 años de los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E fue diferente según el estado de CDKN2A: un 24% (IC 95%, 1,9 a 46,1) para los que presentaron la delección de CDKN2A y un 68,7% (IC 95%, 52,8 a 70,2) para los que tenían el CDKN2A balanceado ($p=0,005$) (figura 2C del segundo artículo).

Para poder demostrar o validar que los resultados obtenidos en los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E de nuestro hospital (SickKids) eran reales, decidimos reunir una cohorte de gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E. Se obtuvieron 180 tumores de 180 pacientes de 18 hospitales internacionales. Las características de ambas cohortes (SickKids e Internacional) se pueden ver en la tabla suplementaria 1 del segundo artículo. La supervivencia global y la supervivencia libre de progresión fueron similares en las dos cohortes (figura 3 del segundo artículo). Igual que se había visto en nuestra cohorte, la resección incompleta se asociaba con mal pronóstico en estos pacientes ($p=0,0001$) (figura 2B del segundo artículo) y la delección de CDKN2A también se asoció con peor pronóstico ($p=0,02$) (figura 2D del segundo artículo).

En un modelo predictivo que realizamos en ambas cohortes, la combinación de resección incompleta, mutación BRAF V600E y delección de CDKN2A identificó un grupo de altísimo riesgo dentro de los gliomas de bajo grado pediátricos (tabla 2 del segundo artículo). La supervivencia libre de progresión a 5 años para los

pacientes con la mutación BRAF V600E + la delección CDKN2A y una resección incompleta fue del 24% (IC 95%, 1,9 a 46,1) en la cohorte del SickKids y del 15% (IC 95%, 0 a 42) en la cohorte internacional.

5.2.4.- Los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E responden peor a la quimioterapia convencional

Además de analizar la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de los gliomas de bajo grado, decidimos analizar la respuesta a la quimioterapia de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E. Para ello analizamos el tamaño del tumor en las resonancias magnéticas de los pacientes antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia, y a los 6 meses de su administración. A los 6 meses del tratamiento, sólo el 23% de los tumores con la mutación BRAF V600E presentaron una respuesta objetiva a la quimioterapia convencional (>25% de reducción del tumor). Además, el 24% de los tumores presentaron progresión intratratamiento, precisando un cambio del mismo a otra línea de quimioterapia o a radioterapia. Esto es algo poco habitual en los gliomas de bajo grado pediátricos tratados con protocolos convencionales⁵¹. Lo más interesante es que esta baja tasa de respuesta no se modificó según utilizáramos primera, segunda o tercera línea de tratamiento (figura 3 del segundo artículo).

5.2.5.- Los inhibidores BRAF V600E como alternativa de tratamiento en estos pacientes

Los inhibidores de BRAF V600E se vienen utilizando ya desde hace muchos años en adultos con melanoma con buenos resultados y buena tolerancia¹⁸⁶. Los ensayos clínicos en gliomas pediátricos con inhibidores de BRAF V600E están en desarrollo y todavía no conocemos los resultados definitivos. Sin embargo, existen ya multitud de casos recogidos en la literatura de pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado y mutación BRAF V600E que han tenido respuestas a estos fármacos^{81,187-189}. Recogimos en nuestro hospital y en los hospitales internacionales, el número de casos de gliomas de bajo grado pediátricos que habían sido tratados con inhibidores de BRAF V600E por uso compasivo. Recogimos un total de 6 casos que habían recibido un inhibidor de BRAF V600E por progresión tras tratamientos convencionales. Los 6 pacientes presentaron una respuesta muy significativa al tratamiento dirigido con el inhibidor con reducción tumoral del 49 al 80% en los 6 casos medida por RM (figura 3 del segundo artículo). Actualizado a fecha del 15 de Mayo de 2017, los 6 pacientes recogidos en la publicación, continuaban recibiendo el inhibidor de BRAF V600E con una mediana de seguimiento desde que se inició el tratamiento de 18,5 meses (rango 15 – 36 meses). En uno de los pacientes el inhibidor se suspendió tras 2 años de tratamiento. El paciente desarrolló progresión clínica y radiológica, el inhibidor se administró de nuevo y el paciente volvió a responder desde el punto de vista clínico y también radiológico. Todavía no conocemos los efectos secundarios de estos tratamientos a largo plazo, ni tampoco los mecanismos de resistencia que

pueden hacer estos tumores a tratamientos prolongados y desconocemos el tiempo que hay que mantener los mismos. La experiencia representada en este estudio nos hace ser optimistas para el futuro. La rápida respuesta tumoral que parece que se obtiene con estos tratamientos podría ser muy beneficiosa sobre todo en aquellos pacientes en los que presentan un deterioro neurológico o visual rápido y progresivo tras iniciar tratamiento convencional.

Como conclusión, este estudio demuestra que los gliomas de bajo grado pediátricos con la mutación BRAF V600E se comportan como una enfermedad diferente y precisan de una estrategia también diferente tanto a corto como a largo plazo. El diagnóstico precoz de esta alteración molecular es necesario para poder definir el pronóstico de los pacientes, y también para plantear cirugías más agresivas y/o tratamientos dirigidos. Necesitamos un cambio en la forma de afrontar los gliomas de bajo grado pediátricos. La biopsia y el diagnóstico molecular en todos los pacientes, incluyendo los tumores de la línea media que en ocasiones se siguen tratando sin confirmación histológica, mejorará la caracterización y el pronóstico de los mismos en esta nueva era de la medicina de precisión.

5.3.- CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y CLÍNICAS DE LOS LACTANTES CON GLIOMAS DE BAJO GRADO

5.3.1.- Gliomas de bajo grado en lactantes

Distintos estudios han identificado que los lactantes (menores de un año) con gliomas de bajo grado, tienen mal pronóstico con tratamientos convencionales^{27,49-52}. Además, como la cirugía tiene un papel muy limitado en los tumores de línea media, muchos de estos lactantes no son biopsiados y se inicia tratamiento por las características de imagen en las pruebas radiológicas, quedando el paciente sin confirmación histológica y por lo tanto sin estudios moleculares.

En la tercera publicación, presentamos un caso de una lactante de 2 meses de edad que acude a la urgencia del hospital con síntomas de una semana de duración que consistían en nistagmo pendular, hipotonía, letargia y aumento del perímetro cefálico. Al examen físico, se apreció sólo percepción de la luz sin seguimiento de los objetos. Se realizó una RM que evidenció una gran masa supraselar con alta captación de gadolinio de 40x39x60 mm con efecto de masa asociado y hidrocefalia importante (figura 1A del tercer artículo). No había historia familiar de cáncer ni de otros antecedentes significativos para el caso y en la exploración física no había signos de neurofibromatosis tipo I. Junto a la colocación de una válvula de derivación ventrículo-peritoneal se decidió realizar una biopsia de la tumoración. La anatomía patológica confirmó el diagnóstico de glioma de

bajo grado (OMS grado I). La inmunohistoquímica fue positiva para la mutación BRAF V600E y este dato se confirmó utilizando la ddPCR. Se inició quimioterapia convencional con vinblastina semanal. Sin embargo, en un tiempo muy breve, el paciente desarrollo ascitis con tensión intracraneal elevada e hiponatremia grave (Na 117 mmol/L). Además, el paciente presentó características de síndrome diencefálico incluyendo bajo peso (percentil <3) y un alto porcentaje de la predicción del gasto de energía en reposo medido con calorimetría (162%) a pesar de un aporte calórico adecuado. El paciente precisó de ingreso en UCIP para su tratamiento y vigilancia. La RM craneal realizada a los 40 días del diagnóstico evidenció progresión de la masa supraselar con un aumento significativo del tumor (81x72x66 mm) (figura 1B del tercer artículo). Ante la rápida progresión tumoral y el deterioro clínico de la paciente, con claro riesgo vital, se decide iniciar tratamiento con dabrafenib (inhibidor de BRAF V600E) por uso compasivo. La paciente comienza el tratamiento y en 2 semanas ya se aprecia una mejoría clínica significativa con disminución de la ascitis, normalización de los niveles de sodio en sangre e inicio de la tolerancia oral. Al mes del inicio del tratamiento la paciente se encontraba en su domicilio con buena tolerancia oral, con mejoría del nistagmus y con mejoría visual, capaz de seguir los objetos con la mirada y mejorando también el nistagmo que ya era solo intermitente. En la RM a los dos meses de iniciar el tratamiento, se objetivó una reducción significativa en el tamaño del tumor del 71%. La paciente ganó peso y en la calorimetría se evidenció una reducción de la predicción del gasto de energía en reposo en un 30%. La RM a los 10 meses de iniciar el tratamiento confirmaba la reducción tumoral (38x29x20 mm) (FIGURA 1C DEL TERCER PAPER), con importante mejoría de la visión y un peso y

desarrollo psicomotor adecuados para su edad. La paciente no ha presentado efectos secundarios significativos con el fármaco salvo eczema moderado tratado con tratamiento tópico.

5.3.2.- Prevalencia de las mutaciones BRAF en lactantes con gliomas de bajo grado

Para conocer la prevalencia de la mutación BRAF V600E en los lactantes, revisamos todos los gliomas de bajo grado pediátricos del hospital SickKids desde 1985 hasta 2015⁶⁶. De 889 pacientes de los que se pudieron recoger datos, 32 tenían menos de un año. De los 32 pacientes, obtuvimos tejido en 15 (9 pacientes no habían sido biopsiados y en 8 no había suficiente tejido para el análisis molecular). De los 15 pacientes en los que realizamos análisis molecular, 5 presentaron la mutación BRAF V600E (33%). En estos 5 pacientes, los tumores progresaron y requirieron múltiples tratamientos. De los 4 pacientes con suficiente seguimiento, 1 paciente falleció 13 años desde el diagnóstico debido a transformación maligna del tumor y los otros 3 han presentado secuelas neurocognitivas y endocrinas significativas (tabla 1 del tercer artículo).

Como se ha afirmado anteriormente, distintas publicaciones describen el comportamiento más agresivo de los gliomas de bajo grado en los pacientes menores de 3 años cuando son comparados con pacientes pediátricos de mayor edad^{27,49-52}. Además, estos pacientes van a requerir múltiples líneas de tratamiento quimioterápico, a veces múltiples cirugías y muchas veces tratamiento con radioterapia con la morbilidad asociada y las discapacidades posteriores

asociadas al propio tumor, a la hidrocefalia y a los tratamientos recibidos. La alta prevalencia de alteraciones moleculares que pueden ser específicamente dirigidas con los nuevos tratamientos moleculares en los gliomas de bajo grado^{54,67} y en particular nuestra serie de lactantes sin neurofibromatosis y con gliomas de bajo grado, con una incidencia de la mutación BRAF V600E del 33%, abre una oportunidad para tratamientos precoces en este tipo de pacientes que pudieran mejorar la supervivencia y sobre todo la funcionalidad a largo plazo de estos pacientes.

Actualmente existen ensayos clínicos abiertos en América del Norte y Europa con inhibidores de la mutación BRAF V600E (identificados en clinicaltrials.gov con los números 1677741 y 1748149). Sin embargo, estos ensayos o excluyen directamente a los pacientes menores de 12 meses o no incluyen a los pacientes que no pueden tragar cápsulas, con los que este grupo de edad está excluido de estos ensayos. La eficacia, buena tolerancia y los escasos efectos secundarios a corto plazo mostrados por nuestro paciente hace recomendar la apertura de este tipo de ensayos a menores de 1 año.

La mejoría de la visión en los pacientes pediátricos de bajo grado es raramente vista con los tratamientos convencionales, sobre todo cuando existe un déficit grave¹⁷⁰. Esto es debido a la muerte neural, consecuencia del daño axonal retrógrado producido por la presión del tumor o de la hidrocefalia. La mejoría clara de la visión en nuestro paciente apoyaría la intervención precoz con este tipo de tratamientos dirigidos en estos casos.

El síndrome diencefálico es una alteración rara pero potencialmente mortal que se observa típicamente en niños muy pequeños con gliomas de bajo grado localizados en el área hipotálamo-quiasmática¹⁹⁰. Es considerado un factor de mal pronóstico en la enfermedad localizada o diseminada^{27,49,190-193}. Definido por Russell en 1951, se caracteriza por una desnutrición grave con fallo de medro a pesar de un aporte calórico adecuado y un crecimiento acorde con la edad del paciente. Además puede asociar actividad motora aumentada, palidez, vómitos, nistagmo y el lactante suele presentar un estado alegre mantenido que puede derivar incluso en euforia^{192,194,195}. Tras el tratamiento del tumor, se recomienda una vigilancia intensiva para prevenir la obesidad y otras secuelas a largo plazo ya que la normalización del estado metabólico a medio-largo plazo es muy difícil en estos pacientes¹⁹⁶. La buena respuesta del síndrome diencefálico en el paciente publicado nos hace plantearnos muy seriamente la buena eficacia de los tratamientos precoces dirigidos en este tipo de pacientes.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1.- La vinblastina es eficaz como quimioterapia de primera línea en pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado que precisen tratamiento adyuvante. Los pacientes se pueden beneficiar de un tratamiento con menor toxicidad comparado con otros regímenes de quimioterapia y con cifras similares en términos de supervivencia global, progresión libre de enfermedad y respuesta en aquellos con afectación de la visión.

2.- Se demuestra que en aquellos pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado y neurofibromatosis tipo I, la vinblastina tiene una supervivencia libre de progresión significativamente mayor que en aquellos pacientes sin neurofibromatosis tipo I.

3.- La vinblastina es un tratamiento fácil de administrar y de bajo coste económico, tiene muy pocos efectos secundarios a corto plazo y excepcionalmente alguno a largo plazo. Se demuestra que los pacientes mantienen una calidad de vida adecuada durante su administración. Por todo ello, la implementación a nivel universal de la vinblastina como tratamiento de primera línea en estos pacientes se muestra muy prometedora, sobre todo en aquellos países de bajo y medio nivel socioeconómico en donde el aspecto económico y el de la toxicidad relacionada con el tratamiento son prioritarios.

4.- La incidencia de la mutación BRAF V600E en los gliomas de bajo grado pediátricos es mayor que la esperada, con un predominio en los subtipos histológicos correspondientes al xantastrocitoma pleomórfico, el ganglioglioma y el astrocitoma difuso. Más de un tercio de los gliomas de bajo grado con la mutación BRAF V600E se localizan en la línea media.

5.- La mutación BRAF V600E en los gliomas de bajo grado pediátricos se asocia con un peor pronóstico definido por una peor supervivencia libre de progresión y una peor respuesta a los tratamientos convencionales (quimioterapia y radioterapia). El mal pronóstico de esta mutación se incrementa cuando se asocia a la delección de CDKN2A.

6.- Los inhibidores de la mutación BRAF V600E pueden tener un papel fundamental en el tratamiento de estos tumores en un futuro muy próximo. Hacen falta más ensayos clínicos que demuestren su verdadera efectividad. Dadas las consecuencias de estas alteraciones moleculares en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico de estos pacientes, se recomienda la biopsia de todos los pacientes pediátricos con gliomas de bajo grado, incluidos los menores de un año, para poder caracterizar molecularmente a estos tumores y disponer de una información pronóstica y terapéutica de vital importancia.

ABREVIATURAS

7.- ABREVIATURAS O ACRÓNIMOS

CAR: “chimeric antigen receptor”

CCNU: lomustina

COG: “Children’s Oncology Group”

CTLA-4: “Cytotoxic lymphocyte antigen 4”

ddPCR: “Droplet digital Polymerase Chain Reaction”

DIPG: Glioma difuso intrínseco pontino

DNET: Tumor neuroepitelial disembrionárico

FGFR: “Fibroblast Growth Factor Receptors”

HDAC: Inhibidores de la histona deacetilasa

IMRT: Radioterapia de intensidad modulada

MAPK: “Mitogen-activated protein kinases”

MEK: “mitogen-activated protein kinase enzyme”

mTOR: “mammalian target of rapamycin”

NF-1: Neurofibromatosis tipo I

NOS: “not otherwise specified”

NTRK: “Neurotrophic tyrosine kinase receptor”

PBTC: “Pediatric Brain Tumor Consortium”

PD-1: “Programmed death 1”

RM: resonancia magnética

SEGA: “Subependymal Giant Cell Astrocytoma”

SFOP: Sociedad Francesa de Oncología Pediátrica

SG: supervivencia global

SIOP: Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNC: Sistema nervioso central

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos

TPCV: Tioguanina + procarbina + CCNU + vincristina

BIBLIOGRAFIA

8.- BIBLIOGRAFIA

1. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):83-103.
2. Sievert AJ, Fisher MJ. Pediatric low-grade gliomas. *J Child Neurol.* 2009;24(11):1397-1408.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl_5):v1-v75.
4. Fuller GN, Scheithauer BW. The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities. *Brain Pathol.* 2007;17(3):304-307.
5. Cruz O. *Tumores del SNC I: gliomas,ependimomas y otros tumores no embrionarios.* Tercera edición. ed2015.
6. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2016. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). Valencia: Universitat de València, 2017 (Edición Preliminar)
7. Chalil A, Ramaswamy V. Low Grade Gliomas in Children. *J Child Neurol.* 2015.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.

9. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820.
10. Chamdine O, Broniscer A, Wu S, Gajjar A, Qaddoumi I. Metastatic Low-Grade Gliomas in Children: 20 Years' Experience at St. Jude Children's Research Hospital. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(1):62-70.
11. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science.* 1990;249(4965):181-186.
12. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell.* 1990;62(1):187-192.
13. Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(2):327-332.
14. Rodriguez FJ, Perry A, Gutmann DH, et al. Gliomas in neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic study of 100 patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(3):240-249.
15. Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP. von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. *Ophthalmology.* 1984;91(8):929-935.
16. Duat Rodriguez A, Martos Moreno GA, Martin Santo-Domingo Y, et al. [Phenotypic and genetic features in neurofibromatosis type 1 in children]. *An Pediatr (Barc).* 2015;83(3):173-182.

17. Listernick R, Ferner RE, Liu GT, Gutmann DH. Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: controversies and recommendations. *Ann Neurol*. 2007;61(3):189-198.
18. Fried I, Hawkins C, Scheinemann K, et al. Favorable outcome with conservative treatment for children with low grade brainstem tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(4):556-560.
19. Fisher MJ, Loguidice M, Gutmann DH, et al. Visual outcomes in children with neurofibromatosis type 1-associated optic pathway glioma following chemotherapy: a multicenter retrospective analysis. *Neuro Oncol*. 2012;14(6):790-797.
20. Perilongo G, Moras P, Carollo C, et al. Spontaneous partial regression of low-grade glioma in children with neurofibromatosis-1: a real possibility. *J Child Neurol*. 1999;14(6):352-356.
21. Packer RJ, Savino PJ, Bilaniuk LT, et al. Chiasmatic gliomas of childhood. A reappraisal of natural history and effectiveness of cranial irradiation. *Childs Brain*. 1983;10(6):393-403.
22. Schmandt SM, Packer RJ, Vezina LG, Jane J. Spontaneous regression of low-grade astrocytomas in childhood. *Pediatr Neurosurg*. 2000;32(3):132-136.
23. Ater JL, Xia C, Mazewski CM, et al. Nonrandomized comparison of neurofibromatosis type 1 and non-neurofibromatosis type 1 children who received carboplatin and vincristine for progressive low-grade glioma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2016.

24. Packer RJ, Ater J, Allen J, et al. Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low-grade gliomas. *J Neurosurg.* 1997;86(5):747-754.
25. Bouffet E, Jakacki R, Goldman S, et al. Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2012;30(12):1358-1363.
26. Ater JL, Xia C, Mazewski CM, et al. Nonrandomized comparison of neurofibromatosis type 1 and non-neurofibromatosis type 1 children who received carboplatin and vincristine for progressive low-grade glioma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 2016;122(12):1928-1936.
27. Gnekow AK, Falkenstein F, von Hornstein S, et al. Long-term follow-up of the multicenter, multidisciplinary treatment study HIT-LGG-1996 for low-grade glioma in children and adolescents of the German Speaking Society of Pediatric Oncology and Hematology. *Neuro Oncol.* 2012;14(10):1265-1284.
28. Bouffet E, Hargrave D, L C, al. e. Weekly vinblastine for recurrent/progressive Low Grade Gliomas. Abstract presented at XXXIV SIOP Meeting; 2002.
29. Gururangan S, Fangusaro J, Poussaint TY, et al. Efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent low-grade gliomas--a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncol.* 2014;16(2):310-317.
30. Hwang EI, Jakacki RI, Fisher MJ, et al. Long-term efficacy and toxicity of bevacizumab-based therapy in children with recurrent low-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(5):776-782.

31. Packer RJ, Jakacki R, Horn M, et al. Objective response of multiply recurrent low-grade gliomas to bevacizumab and irinotecan. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(7):791-795.
32. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010;464(7287):427-430.
33. Banerjee A, Jakacki RI, Onar-Thomas A, et al. A phase I trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro Oncol*. 2017.
34. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1345-1356.
35. Caban C, Khan N, Hasbani DM, Crino PB. Genetics of tuberous sclerosis complex: implications for clinical practice. *Appl Clin Genet*. 2017;10:1-8.
36. Boer K, Crino PB, Gorter JA, et al. Gene expression analysis of tuberous sclerosis complex cortical tubers reveals increased expression of adhesion and inflammatory factors. *Brain Pathol*. 2010;20(4):704-719.
37. Borkowska J, Schwartz RA, Kotulska K, Jozwiak S. Tuberous sclerosis complex: tumors and tumorigenesis. *Int J Dermatol*. 2011;50(1):13-20.
38. Crino PB. Evolving neurobiology of tuberous sclerosis complex. *Acta Neuropathol*. 2013;125(3):317-332.
39. Crino PB. The pathophysiology of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia*. 2010;51 Suppl 1:27-29.

40. Crino PB. Molecular pathogenesis of tuber formation in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol.* 2004;19(9):716-725.
41. Crino PB, Aronica E, Baltuch G, Nathanson KL. Biallelic TSC gene inactivation in tuberous sclerosis complex. *Neurology.* 2010;74(21):1716-1723.
42. Crino PB, Henske EP. New developments in the neurobiology of the tuberous sclerosis complex. *Neurology.* 1999;53(7):1384-1390.
43. Jozwiak S, Sadowski K, Kotulska K, Schwartz RA. Topical Use of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex-A Comprehensive Review of the Literature. *Pediatr Neurol.* 2016;61:21-27.
44. Sadowski K, Kotulska K, Schwartz RA, Jozwiak S. Systemic effects of treatment with mTOR inhibitors in tuberous sclerosis complex: a comprehensive review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(4):586-594.
45. Krueger DA, Wilfong AA, Mays M, et al. Long-term treatment of epilepsy with everolimus in tuberous sclerosis. *Neurology.* 2016;87(23):2408-2415.
46. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, et al. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381(9861):125-132.
47. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, et al. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis complex: 2-year open-label extension of the randomised EXIST-1 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1513-1520.

48. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, et al. Long-Term Use of Everolimus in Patients with Tuberous Sclerosis Complex: Final Results from the EXIST-1 Study. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158476.
49. Laithier V, Grill J, Le Deley MC, et al. Progression-free survival in children with optic pathway tumors: dependence on age and the quality of the response to chemotherapy--results of the first French prospective study for the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4572-4578.
50. Stokland T, Liu JF, Ironside JW, et al. A multivariate analysis of factors determining tumor progression in childhood low-grade glioma: a population-based cohort study (CCLG CNS9702). *Neuro Oncol*. 2010;12(12):1257-1268.
51. Ater JL, Zhou T, Holmes E, et al. Randomized study of two chemotherapy regimens for treatment of low-grade glioma in young children: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2641-2647.
52. Mirow C, Pietsch T, Berkefeld S, et al. Children <1 year show an inferior outcome when treated according to the traditional LGG treatment strategy: a report from the German multicenter trial HIT-LGG 1996 for children with low grade glioma (LGG). *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(3):457-463.
53. Johnston DL, Keene D, Bartels U, et al. Low grade astrocytoma in children under the age of three years: a report from the Canadian pediatric brain tumour consortium. *J Neurooncol*. 2015;124(1):95-100.
54. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet*. 2013;45(6):602-612.

55. Penman CL, Faulkner C, Lowis SP, Kurian KM. Current Understanding of BRAF Alterations in Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targeting in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Front Oncol.* 2015;5:54.
56. Jones DT, Hutter B, Jager N, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet.* 2013;45(8):927-932.
57. Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, et al. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(20):8188-8193.
58. Ho CY, Mobley BC, Gordish-Dressman H, et al. A clinicopathologic study of diencephalic pediatric low-grade gliomas with BRAF V600 mutation. *Acta Neuropathol.* 2015.
59. Jones DT, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister SM. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(11):1799-1811.
60. Northcott PA, Pfister SM, Jones DT. Next-generation (epi)genetic drivers of childhood brain tumours and the outlook for targeted therapies. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):e293-302.
61. Bergthold G, Bandopadhyay P, Bi WL, et al. Pediatric low-grade gliomas: how modern biology reshapes the clinical field. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1845(2):294-307.
62. Kilday JP, Bartels UK, Bouffet E. Targeted therapy in pediatric low-grade glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(4):441.

63. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4790-4798.
64. Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, Hamilton RL, Pollack IF. Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2012;14(6):777-789.
65. Dahiya S, Haydon DH, Alvarado D, Gurnett CA, Gutmann DH, Leonard JR. BRAF(V600E) mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathol.* 2013;125(6):901-910.
66. Mistry M, Zhukova N, Merico D, et al. BRAF mutation and CDKN2A deletion define a clinically distinct subgroup of childhood secondary high-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2015;33(9):1015-1022.
67. Qaddoumi I, Orisme W, Wen J, et al. Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):833-845.
68. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science.* 2012;337(6099):1231-1235.
69. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008;68(21):8673-8677.
70. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1739-1749.

71. Cin H, Meyer C, Herr R, et al. Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011;121(6):763-774.
72. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450.
73. Forsheew T, Tatevossian RG, Lawson AR, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol.* 2009;218(2):172-181.
74. Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, et al. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One.* 2011;6(3):e17948.
75. Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775-788.
76. Tatevossian RG, Tang B, Dalton J, et al. MYB upregulation and genetic aberrations in a subset of pediatric low-grade gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120(6):731-743.
77. Bandopadhyay P, Ramkissoon LA, Jain P, et al. MYB-QKI rearrangements in angiocentric glioma drive tumorigenicity through a tripartite mechanism. *Nat Genet.* 2016;48(3):273-282.
78. Olar A, Sulman EP. Molecular Markers in Low-Grade Glioma-Toward Tumor Reclassification. *Semin Radiat Oncol.* 2015;25(3):155-163.

79. Dodgshun AJ, SantaCruz N, Hwang J, et al. Disseminated glioneuronal tumors occurring in childhood: treatment outcomes and BRAF alterations including V600E mutation. *J Neurooncol.* 2016;128(2):293-302.
80. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2010;12(7):621-630.
81. Rush S, Foreman N, Liu A. Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol.* 2013;31(10):e159-160.
82. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):928-942.
83. Goetz EM, Garraway LA. Mechanisms of Resistance to Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Inhibition in BRAF-Mutant Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2012:680-684.
84. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014;4(1):94-109.
85. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature.* 2006;439(7074):358-362.
86. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(7):1855-1862.
87. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre,

- double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444-451.
88. Levy JM, Thompson JC, Griesinger AM, et al. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors. *Cancer Discov*. 2014;4(7):773-780.
89. Yao TW, Zhang J, Prados M, Weiss WA, James CD, Nicolaides T. EGFR blockade prevents glioma escape from BRAFV600E targeted therapy. *Oncotarget*. 2015;6(26):21993-22005.
90. Uttarkar S, Piontek T, Dukare S, et al. Small-Molecule Disruption of the Myb/p300 Cooperation Targets Acute Myeloid Leukemia Cells. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(12):2905-2915.
91. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Carloni AC, et al. KIAA1549: BRAF Gene Fusion and FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(7):743-754.
92. Donson AM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, et al. Pediatric brainstem gangliogliomas show BRAF(V600E) mutation in a high percentage of cases. *Brain Pathol*. 2014;24(2):173-183.
93. Raabe EH, Lim KS, Kim JM, et al. BRAF activation induces transformation and then senescence in human neural stem cells: a pilocytic astrocytoma model. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3590-3599.
94. Gong X, Schwartz PH, Linskey ME, Bota DA. Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology*. 2011;76(13):1126-1134.

95. Raabe E, Kieran MW, Cohen KJ. New strategies in pediatric gliomas: molecular advances in pediatric low-grade gliomas as a model. *Clin Cancer Res.* 2013;19(17):4553-4558.
96. Bandopadhyay P, Bergthold G, London WB, et al. Long-term outcome of 4,040 children diagnosed with pediatric low-grade gliomas: an analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(7):1173-1179.
97. Krishnatry R, Zhukova N, Guerreiro Stucklin AS, et al. Clinical and treatment factors determining long-term outcomes for adult survivors of childhood low-grade glioma: A population-based study. *Cancer.* 2016;122(8):1261-1269.
98. Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, et al. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol.* 2012;14(9):1146-1152.
99. Kaul A, Chen YH, Emnett RJ, Dahiya S, Gutmann DH. Pediatric glioma-associated KIAA1549:BRAF expression regulates neuroglial cell growth in a cell type-specific and mTOR-dependent manner. *Genes Dev.* 2012;26(23):2561-2566.
100. Dasgupta T, Olow AK, Yang X, et al. Survival advantage combining a BRAF inhibitor and radiation in BRAF V600E-mutant glioma. *J Neurooncol.* 2016;126(3):385-393.
101. Olow A, Mueller S, Yang X, et al. BRAF Status in Personalizing Treatment Approaches for Pediatric Gliomas. *Clin Cancer Res.* 2016;22(21):5312-5321.

102. Whittaker SR, Cowley GS, Wagner S, Luo F, Root DE, Garraway LA.
Combined Pan-RAF and MEK Inhibition Overcomes Multiple Resistance
Mechanisms to Selective RAF Inhibitors. *Mol Cancer Ther.*
2015;14(12):2700-2711.
103. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T
cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade.
Science. 2016;351(6280):1463-1469.
104. Imielinski BL, Kloc W, Wasilewski W, Liczbik W, Puzyrewski R, Karwacki Z.
Posterior fossa tumors in children--indications for ventricular drainage and
for V-P shunting. *Childs Nerv Syst.* 1998;14(6):227-229.
105. Campbell JW, Pollack IF. Cerebellar astrocytomas in children. *J Neurooncol.*
1996;28(2-3):223-231.
106. Bonfield CM, Steinbok P. Pediatric cerebellar astrocytoma: a review. *Childs
Nerv Syst.* 2015;31(10):1677-1685.
107. Wisoff JH, Sanford RA, Heier LA, et al. Primary neurosurgery for pediatric
low-grade gliomas: a prospective multi-institutional study from the
Children's Oncology Group. *Neurosurgery.* 2011;68(6):1548-1554;
discussion 1554-1545.
108. Steinbok P, Mangat JS, Kerr JM, et al. Neurological morbidity of surgical
resection of pediatric cerebellar astrocytomas. *Childs Nerv Syst.*
2013;29(8):1269-1275.
109. Merchant TE, Kun LE, Wu S, Xiong X, Sanford RA, Boop FA. Phase II trial of
conformal radiation therapy for pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol.*
2009;27(22):3598-3604.

110. Mishra KK, Puri DR, Missett BT, et al. The role of up-front radiation therapy for incompletely resected pediatric WHO grade II low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2006;8(2):166-174.
111. Fisher BJ, Leighton CC, Vujovic O, Macdonald DR, Stitt L. Results of a policy of surveillance alone after surgical management of pediatric low grade gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51(3):704-710.
112. Armstrong GT, Conklin HM, Huang S, et al. Survival and long-term health and cognitive outcomes after low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2011;13(2):223-234.
113. Grill J, Couanet D, Cappelli C, et al. Radiation-induced cerebral vasculopathy in children with neurofibromatosis and optic pathway glioma. *Ann Neurol.* 1999;45(3):393-396.
114. Epstein MA, Packer RJ, Rorke LB, et al. Vascular malformation with radiation vasculopathy after treatment of chiasmatic/hypothalamic glioma. *Cancer.* 1992;70(4):887-893.
115. Merchant TE, Conklin HM, Wu S, Lustig RH, Xiong X. Late effects of conformal radiation therapy for pediatric patients with low-grade glioma: prospective evaluation of cognitive, endocrine, and hearing deficits. *J Clin Oncol.* 2009;27(22):3691-3697.
116. Ruge MI, Simon T, Suchorska B, et al. Stereotactic brachytherapy with iodine-125 seeds for the treatment of inoperable low-grade gliomas in children: long-term outcome. *J Clin Oncol.* 2011;29(31):4151-4159.

117. Kirsch DG, Tarbell NJ. New technologies in radiation therapy for pediatric brain tumors: the rationale for proton radiation therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;42(5):461-464.
118. Harrabi SB, Bougatf N, Mohr A, et al. Dosimetric advantages of proton therapy over conventional radiotherapy with photons in young patients and adults with low-grade glioma. *Strahlenther Onkol*. 2016;192(11):759-769.
119. Eaton BR, Yock T. The use of proton therapy in the treatment of benign or low-grade pediatric brain tumors. *Cancer J*. 2014;20(6):403-408.
120. Mahoney DH, Jr., Cohen ME, Friedman HS, et al. Carboplatin is effective therapy for young children with progressive optic pathway tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *Neuro Oncol*. 2000;2(4):213-220.
121. Moghrabi A, Friedman HS, Burger PC, Tien R, Oakes WJ. Carboplatin treatment of progressive optic pathway gliomas to delay radiotherapy. *J Neurosurg*. 1993;79(2):223-227.
122. Packer RJ, Sutton LN, Bilaniuk LT, et al. Treatment of chiasmatic/hypothalamic gliomas of childhood with chemotherapy: an update. *Ann Neurol*. 1988;23(1):79-85.
123. Massimino M, Spreafico F, Cefalo G, et al. High response rate to cisplatin/etoposide regimen in childhood low-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2002;20(20):4209-4216.
124. Gnekow AK, Kaatsch P, Kortmann R, Wiestler OD. [HIT-LGG: effectiveness of carboplatin-vincristine in progressive low-grade gliomas of childhood--an interim report]. *Klin Padiatr*. 2000;212(4):177-184.

125. Chintagumpala M, Eckel SP, Krailo M, et al. A pilot study using carboplatin, vincristine, and temozolomide in children with progressive/symptomatic low-grade glioma: a Children's Oncology Group studydagger. *Neuro Oncol.* 2015;17(8):1132-1138.
126. Gnekow A, von Hornstein S, de Salvo G, et al. SIOP-LGG 2004: A randomized chemotherapy trial and a radiotherapy trial embedded into a comprehensive treatment strategy for low grade glioma in children and adolescents. *Pediatric Blood & Cancer.* 2006;47(4):388.
127. Perry JR, Brown MT, Gockerman JP. Acute leukemia following treatment of malignant glioma. *J Neurooncol.* 1998;40(1):39-46.
128. Aubier F, Flamant F, Brauner R, Caillaud JM, Chaussain JM, Lemerle J. Male gonadal function after chemotherapy for solid tumors in childhood. *J Clin Oncol.* 1989;7(3):304-309.
129. Le Deley MC, Leblanc T, Shamsaldin A, et al. Risk of secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: a case-control study by the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1074-1081.
130. Su YW, Chang MC, Chiang MF, Hsieh RK. Treatment-related myelodysplastic syndrome after temozolomide for recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol.* 2005;71(3):315-318.
131. Lafay-Cousin L, Holm S, Qaddoumi I, et al. Weekly vinblastine in pediatric low-grade glioma patients with carboplatin allergic reaction. *Cancer.* 2005;103(12):2636-2642.

132. Fisher BJ, Hu C, Macdonald DR, et al. Phase 2 study of temozolomide-based chemoradiation therapy for high-risk low-grade gliomas: preliminary results of Radiation Therapy Oncology Group 0424. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;91(3):497-504.
133. Nicholson HS, Kretschmar CS, Krailo M, et al. Phase 2 study of temozolomide in children and adolescents with recurrent central nervous system tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 2007;110(7):1542-1550.
134. Gururangan S, Fisher MJ, Allen JC, et al. Temozolomide in children with progressive low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2007;9(2):161-168.
135. Khaw SL, Coleman LT, Downie PA, Heath JA, Ashley DM. Temozolomide in pediatric low-grade glioma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(6):808-811.
136. Warren KE, Goldman S, Pollack IF, et al. Phase I trial of lenalidomide in pediatric patients with recurrent, refractory, or progressive primary CNS tumors: Pediatric Brain Tumor Consortium study PBTC-018. *J Clin Oncol.* 2011;29(3):324-329.
137. Seymour L, Ivy SP, Sargent D, et al. The design of phase II clinical trials testing cancer therapeutics: consensus recommendations from the clinical trial design task force of the national cancer institute investigational drug steering committee. *Clin Cancer Res.* 2010;16(6):1764-1769.
138. Avery RA, Hwang EI, Jakacki RI, Packer RJ. Marked recovery of vision in children with optic pathway gliomas treated with bevacizumab. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(1):111-114.

139. Scheinemann K, Bartels U, Tsangaris E, et al. Feasibility and efficacy of repeated chemotherapy for progressive pediatric low-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(1):84-88.
140. Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res*. 2005;65(7):2755-2760.
141. Kieran M, Yao X, Macy M, Geyer JR, Cohen KJ, Macdonald T. A prospective multi institutional Phase II study of everolimus (RAD001), an mTOR inhibitor in pediatric patients with recurrent or progressive low-grade glioma. A POETIC Consortium trial. . *Pediatric Blood & Cancer*. 2013;11(1):19.
142. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358-365.
143. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-819.
144. Kieran MW. Targeting BRAF in pediatric brain tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014:e436-440.
145. Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, et al. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol*. 2014;16(10):1408-1416.

146. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-390.
147. Ren PP, Li M, Li TF, Han SY. Anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor-modified T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2017.
148. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*. 2017.
149. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2561-2569.
150. Okada H, Butterfield LH, Hamilton RL, et al. Induction of robust type-I CD8+ T-cell responses in WHO grade 2 low-grade glioma patients receiving peptide-based vaccines in combination with poly-ICLC. *Clin Cancer Res*. 2015;21(2):286-294.
151. Rosenstock JG, Evans AE, Schut L. Response to vincristine of recurrent brain tumors in children. *J Neurosurg*. 1976;45(2):135-140.
152. Lefkowitz IB, Packer RJ, Sutton LN, et al. Results of the treatment of children with recurrent gliomas with lomustine and vincristine. *Cancer*. 1988;61(5):896-902.
153. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y, Pollack IF. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2010;119(5):641-649.

154. Packer RJ, Lange B, Ater J, et al. Carboplatin and vincristine for recurrent and newly diagnosed low-grade gliomas of childhood. *J Clin Oncol*. 1993;11(5):850-856.
155. Dodgshun AJ, Hansford JR, Cole T, Choo S, Sullivan MJ. Carboplatin hypersensitivity reactions in pediatric low grade glioma are protocol specific and desensitization shows poor efficacy. *Pediatr Blood Cancer*. 2015.
156. Rousset-Jablonski C, Giscard d'Estaing S, Bernier V, et al. [Gonadal function after treatment for a childhood or adolescent cancer]. *Bull Cancer*. 2015;102(7-8):602-611.
157. Massimino M, Spreafico F, Riva D, et al. A lower-dose, lower-toxicity cisplatin-etoposide regimen for childhood progressive low-grade glioma. *J Neurooncol*. 2010;100(1):65-71.
158. Bowers DC, Liu Y, Leisenring W, et al. Late-occurring stroke among long-term survivors of childhood leukemia and brain tumors: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2006;24(33):5277-5282.
159. Dirks PB, Jay V, Becker LE, et al. Development of anaplastic changes in low-grade astrocytomas of childhood. *Neurosurgery*. 1994;34(1):68-78.
160. Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000;105(8):R15-24.
161. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, et al. Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine

- (ABVD) followed by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stages I, II, and IIIA nonbulky Hodgkin disease. *Blood*. 2004;104(12):3483-3489.
162. Alexander S, Kravaka JM, Weitzman S, et al. Advanced stage anaplastic large cell lymphoma in children and adolescents: results of ANHL0131, a randomized phase III trial of APO versus a modified regimen with vinblastine: a report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(12):2236-2242.
163. Laly P, Ingen-Housz-Oro S, Beylot-Barry M, et al. Efficacy of Vinblastine in Primary Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma. *JAMA Dermatol*. 2015.
164. Ladisch S, Gadner H, Arico M, et al. LCH-I: a randomized trial of etoposide vs. vinblastine in disseminated Langerhans cell histiocytosis. The Histiocyte Society. *Med Pediatr Oncol*. 1994;23(2):107-110.
165. Ng Wing Tin S, Martin-Duverneuil N, Idbaih A, et al. Efficacy of vinblastine in central nervous system Langerhans cell histiocytosis: a nationwide retrospective study. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:83.
166. von Stebut E, Schadmand-Fischer S, Brauninger W, Kreft A, Doberauer C, Steinbrink K. Successful treatment of adult multisystemic Langerhans cell histiocytosis with psoralen-UV-A, prednisolone, mercaptopurine, and vinblastine. *Arch Dermatol*. 2008;144(5):649-653.
167. Kono T, Tomita I, Chisato N, Matsuda M, Kakisaka A, Kasai S. Successful low-dose chemotherapy using vinblastine and methotrexate for the treatment of an ileoanal pouch mesenteric desmoid tumor: report of a case. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(2):246-249.

168. Skapek SX, Ferguson WS, Granowetter L, et al. Vinblastine and methotrexate for desmoid fibromatosis in children: results of a Pediatric Oncology Group Phase II Trial. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):501-506.
169. Skapek SX, Hawk BJ, Hoffer FA, et al. Combination chemotherapy using vinblastine and methotrexate for the treatment of progressive desmoid tumor in children. *J Clin Oncol.* 1998;16(9):3021-3027.
170. Moreno L, Bautista F, Ashley S, Duncan C, Zacharoulis S. Does chemotherapy affect the visual outcome in children with optic pathway glioma? A systematic review of the evidence. *Eur J Cancer.* 2010;46(12):2253-2259.
171. Broniscer A, Gururangan S, MacDonald TJ, et al. Phase I trial of single-dose temozolomide and continuous administration of o6-benzylguanine in children with brain tumors: a pediatric brain tumor consortium report. *Clin Cancer Res.* 2007;13(22 Pt 1):6712-6718.
172. Cappellano AM, Petrilli AS, da Silva NS, et al. Single agent vinorelbine in pediatric patients with progressive optic pathway glioma. *J Neurooncol.* 2015;121(2):405-412.
173. Heath JA, Turner CD, Poussaint TY, Scott RM, Goumnerova L, Kieran MW. Chemotherapy for progressive low-grade gliomas in children older than ten years: the Dana-Farber experience. *Pediatr Hematol Oncol.* 2003;20(7):497-504.
174. Dodgshun AJ, Maixner WJ, Heath JA, Sullivan MJ, Hansford JR. Single agent carboplatin for pediatric low-grade glioma: A retrospective analysis shows equivalent efficacy to multiagent chemotherapy. *Int J Cancer.* 2015.

175. Chong AL, Pole JD, Scheinemann K, et al. Optic pathway gliomas in adolescence--time to challenge treatment choices? *Neuro Oncol.* 2013;15(3):391-400.
176. Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, et al. The role of telomere maintenance in the spontaneous growth arrest of pediatric low-grade gliomas. *Neoplasia.* 2006;8(2):136-142.
177. Huillard E, Hashizume R, Phillips JJ, et al. Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(22):8710-8715.
178. Palmer SN, Meeske KA, Katz ER, Burwinkle TM, Varni JW. The PedsQL Brain Tumor Module: initial reliability and validity. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(3):287-293.
179. Roden AC, Hu X, Kip S, et al. BRAF V600E expression in Langerhans cell histiocytosis: clinical and immunohistochemical study on 25 pulmonary and 54 extrapulmonary cases. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(4):548-551.
180. Behling F, Barrantes-Freer A, Skardelly M, et al. Frequency of BRAF V600E mutations in 969 central nervous system neoplasms. *Diagn Pathol.* 2016;11(1):55.
181. Myung JK, Cho H, Park CK, Kim SK, Lee SH, Park SH. Analysis of the BRAF(V600E) Mutation in Central Nervous System Tumors. *Transl Oncol.* 2012;5(6):430-436.
182. Schindler G, Capper D, Meyer J, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in

- pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011;121(3):397-405.
183. Berg M, Nordgaard O, Korner H, et al. Molecular subtypes in stage II-III colon cancer defined by genomic instability: early recurrence-risk associated with a high copy-number variation and loss of RUNX3 and CDKN2A. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122391.
184. Alhejaily A, Day AG, Feilotter HE, Baetz T, Lebrun DP. Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2014;20(6):1676-1686.
185. Jacob K, Quang-Khuong DA, Jones DT, et al. Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4650-4660.
186. Banzi M, De Blasio S, Lallas A, et al. Dabrafenib: a new opportunity for the treatment of BRAF V600-positive melanoma. *Onco Targets Ther.* 2016;9:2725-2733.
187. del Bufalo F, Carai A, Figa-Talamanca L, et al. Response of recurrent BRAFV600E mutated ganglioglioma to Vemurafenib as single agent. *J Transl Med.* 2014;12:356.
188. Skrypek M, Foreman N, Guillaume D, Moertel C. Pilomyxoid astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(11):2099-2100.

189. Aguilera D, Janss A, Mazewski C, et al. Successful Retreatment of a Child with a Refractory Brainstem Ganglioglioma with Vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(3):541-543.
190. Burr IM, Slonim AE, Danish RK, Gadoth N, Butler IJ. Diencephalic syndrome revisited. *J Pediatr*. 1976;88(3):439-444.
191. Perilongo G, Carollo C, Salviati L, et al. Diencephalic syndrome and disseminated juvenile pilocytic astrocytomas of the hypothalamic-optic chiasm region. *Cancer*. 1997;80(1):142-146.
192. Bain HW, Dart J, Keith WS, Kruff E. The diencephalic syndrome of early infancy due to silent brain tumor: with special reference to treatment. *Pediatrics*. 1966;38(3):473-482.
193. Fleischman A, Brue C, Poussaint TY, et al. Diencephalic syndrome: a cause of failure to thrive and a model of partial growth hormone resistance. *Pediatrics*. 2005;115(6):e742-748.
194. Gropman AL, Packer RJ, Nicholson HS, et al. Treatment of diencephalic syndrome with chemotherapy: growth, tumor response, and long term control. *Cancer*. 1998;83(1):166-172.
195. Addy DP, Hudson FP. Diencephalic syndrome of infantile emaciation. Analysis of literature and report of further 3 cases. *Arch Dis Child*. 1972;47(253):338-343.
196. Kilday JP, Bartels U, Huang A, et al. Favorable survival and metabolic outcome for children with diencephalic syndrome using a radiation-sparing approach. *J Neurooncol*. 2014;116(1):195-204.